

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année 1935-1936 — N° 7

RECHERCHES
MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES
SUR DES BACTÉRIES MUQUEUSES
(PNEUMOBACILLE DE FRIEDLANDER ET BACILLES VOISINS)

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 1^{er} juillet 1936

PAR

Yvonne CADO

PHARMACIEN
LAURÉATE DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Jury } MM. LUTZ, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
BACH, *Professeur.*

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS
15, RUE RACINE, 15

1936

RECHERCHES
MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES
SUR DES BACTÉRIES MUQUEUSES

(Pneumobacille de Friedlander et bacilles voisins)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552210_0039

RECHERCHES
MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES
SUR DES BACTÉRIES MUQUEUSES
(PNEUMOBACILLE DE FRIEDLANDER ET BACILLES VOISINS)

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 1^{er} juillet 1936

PAR
Yvonne CADO

PHARMACIEN
LAURÉATE DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Jury { MM. LUTZ, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
BACH, *Professeur.*

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS
15, RUE RACINE, 15

1936

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. *, ☉ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, ☉ I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, *, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. *, ☉ I. Botanique générale.
PERROT, C. *, ☉ I. Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. *, ☉ I. Zoologie.
LEBEAU, O. *, ☉ I. Pharmacie chimique.
BOURGAULT, O. *, ☉ I. Chimie analytique.
GORIS, O. *, ☉ I. Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, ☉ I. Physique.
DAMIENS, *, ☉ I. Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, ☉ I. Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☉ I. Chimie organique.
LUTZ, *, ☉ I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, *, ☉ I. Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☉ I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G.O. *, ☉ I. et DELÉPINE, O. *, ☉ I., membres de l'Institut
et GUERBET, *, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, ☉ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, ☉ I. Pharmacodynamie.
DELABY, *, ☉ I. Hydrologie et Hygiène.
PICON, ☉ I. Chimie minérale.
BACH, ☉ I. Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, ☉ A.	MM. BACH, ☉ I.
PICON, ☉ I.	BEDEL, ☉ I.
MASCRE, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
FLEURY, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I., *agrégé*, chargé des T. P. de 1^{re} année. Chimie générale.
FLEURY, ☉ I. et RÉGNIER, ☉ I. : *agrégés*,
chargés des travaux de Chimie analytique.

SOUÈGES, ☉ I. Micrographie.
LEROUX, ☉ I. Physique.
DEVAL, *, ☉ I. Microbiologie.
DELABY, *, ☉ I., PICON, ☉ I. et MASCRÉ, ☉ I. :

agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☉ I.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MON ONCLE

A MA MÈRE

*En témoignage de ma profonde
affection.*

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MON MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR LÉVY-BRUHL

Ex-interne des hôpitaux de Paris
Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur

*Avec mes remerciements, en témoi-
gnage de ma vive reconnaissance.*

RECHERCHES MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR DES BACTÉRIES MUQUEUSES

(Pneumobacille de Friedlander et bacilles voisins)

AVANT-PROPOS

Au début de ce travail qu'il nous soit permis de remercier bien vivement tous ceux qui, pendant deux années de recherches ne cessèrent de nous guider de leurs précieux conseils et de nous encourager dans une tâche souvent ingrate.

Orientée par M. DEVAL, chef de travaux pratiques de Microbiologie à la Faculté de pharmacie de Paris et qui nous témoigna toujours la plus grande bienveillance, vers le laboratoire de M. le Dr LÉVY-BRUHL à l'Institut Pasteur, nous avons pu travailler dans une atmosphère de science et de bonté. Que M. le Dr LÉVY-BRUHL qui nous inspira ce travail et nous guida sans cesse, trouve ici l'expression de notre très profond attachement et qu'il nous permette de lui dédier ces pages.

Une partie de nos recherches fut effectuée au laboratoire de Chimie biologique de l'Institut National Agronomique. Pour son aimable accueil, à M. le Professeur LÉMOIGNE, nous adressons nos sentiments de vive gratitude. Nous remercions aussi bien sincèrement pour son aide précieuse, M. DESVEAUX, son préparateur si dévoué et si complaisant.

Nous prions M. le Professeur LUTZ qui nous fit l'hon-

neur d'accepter la présidence de cette thèse, de vouloir bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A M. le Professeur FABRE et M. le Professeur agrégé BACH qui voulurent bien faire partie de notre jury, nous adressons nos respectueux remerciements.

INTRODUCTION

Les bacilles du groupe *Coli-lactis-aerogènes* font l'objet de nombreux essais de classification.

L'hétérogénéité de ce groupe rend cette tâche particulièrement difficile et le praticien, en présence d'un de ces germes, est souvent fort embarrassé pour établir un diagnostic bactériologique précis.

Des travaux très importants ont précisé d'abord la nature chimique puis le rôle immunologique de la « capsule » caractéristique d'une certaine famille de ces éléments microbiens.

D'autre part les recherches sur la nutrition de ces bactéries apparaissent comme particulièrement intéressantes du fait de leur aptitude à pousser en milieux synthétiques extrêmement simples, ce qui facilite l'étude de leur métabolisme.

Dans notre travail nous avons étudié systématiquement aux points de vue bactériologique et biochimique une quarantaine de souches de bacilles muqueux d'origines les plus diverses. Nous avons essayé d'en définir les caractères, opposant le Pneumobacille vrai au Coli typique et signalant les formes intermédiaires.

Ces recherches nous ont parfois orientée vers des points particuliers de la biochimie qu'il nous paraît intéressant de publier ici et qui pourront faire l'objet de travaux ultérieurs.

Nous regrettons vivement de n'avoir pu en achever la mise au point dans cette publication et nous nous proposons d'en poursuivre l'étude.

PLAN

CHAPITRE PREMIER

Historique du pneumobacille de Friedlander et des bacilles voisins.

Leur fréquence, leur répartition.

Leurs conditions générales de développement.

Leur rôle pathogène.

CHAPITRE II

Caractères morphologiques de 42 souches de bacilles muqueux.

1° *Macroscopiques* ;

2° *Microscopiques*.

CHAPITRE III

Etude biochimique.

1° *Nutrition azotée* ;

2° *Nutrition carbonée*.

CHAPITRE IV

Mutations observées dans quelques souches bactériennes.

CHAPITRE V

Observations sur le pouvoir toxigène de quelques bacilles.

CONCLUSIONS.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

Certains auteurs veulent faire remonter l'histoire des bacilles capsulés jusqu'aux travaux de KLEBS (1880), d'où le nom de « *Klebsiellæ* » sous lequel ils sont désignés dans certaines nomenclatures (Bergey). Mais en réalité les techniques de différenciation microbienne étaient encore trop imparfaites à cette époque pour permettre des descriptions précises et il est difficile de les considérer comme valables.

C'est en 1882 que parut le travail de FRIEDLANDER donnant les premières descriptions du germe qui devait illustrer son nom. L'histoire des recherches successives dont ce microbe fut l'objet est loin, croyons-nous d'être dépourvue d'intérêt. On peut y distinguer une première période où les progrès techniques permettent tout d'abord de différencier cette bactérie d'avec le Pneumocoque (confusion grossière dont les premiers travaux de Friedlander ne sont pas exempts), puis de préciser ses caractères morphologiques et biochimiques. En même temps son rôle pathogène et l'aspect des lésions déterminées par ce bacille étaient étudiés et définis.

Dès la même époque (1882) parurent les premiers travaux consacrés à une autre bactérie capsulée : le bacille du Rhinosclérome décrit à quelques mois de distance par FRISH puis par PUCCINI.

Pendant les années 1883-1886 les données de FRIEDLANDER sont discutées et approfondies. D'une part l'étude du Pneumocoque est poursuivie à l'aide de techniques perfectionnées en particulier par TALAMON en France, FRAENKEL en Allemagne; d'autre part le bacille Gram-néga-

tif capsulé, cultivé en gélatine par FRIEDLANDER est étudié également. Un exposé synthétique, paru en 1886 et dû à WEICHSELBAUM fait le bilan de ces 3 années de recherches ; cet auteur apporte les résultats de recherches personnelles et envisage comme agents pathogènes des affections respiratoires aiguës, par ordre de fréquence décroissante : le Pneumocoque de TALAMON-FRAENKEL, le Streptocoque, le Staphylocoque et enfin le Pneumobacille ; dans la statistique personnelle de WEICHSELBAUM, sur 129 cas, ce dernier germe est rencontré 9 fois à l'examen direct et 6 fois à la culture.

Cette même année 1886 voit apparaître également dans le *Fortschritte der Medizin* une série de publications relatives aux bactéries capsulées, en particulier un travail de PALTAUF et EISELBERG sur les analogies du bacille de FRISCH et de certains germes de l'ozène avec le bacille de FRIEDLANDER.

Mais par la suite, cette notion de spécificité qui paraissait si bien établie se trouve battue en brèche. Des formes intermédiaires entre le Pneumobacille typique et d'autres bactéries : le Colibacille par exemple, sont rencontrées, avec une fréquence non négligeable ; des phénomènes de « mutations » spontanés ou provoqués sont décrits par un nombre croissant de chercheurs. Par contre une spécificité nouvelle, paraît se substituer à la précédente, basée sur la sécrétion de substances chimiquement définies qui servent de substratum à des processus immunologiques des plus intéressants.

En effet ce qui donne un intérêt tout particulier aux études de cette famille microbienne c'est la particularité que présentent ces germes de sécréter des substances gommeuses. Leur nature a été précisée par une série de travaux récents et du point de vue immunologique elles paraissent jouer un rôle important.

En même temps les études thérapeutiques progressent dans diverses voies : bactériothérapie spécifique, chimiothérapie, sérothérapie, et nouvelle venue, diastasothérapie.

Cette dernière méthode repose sur le fait que ces bactéries, privées artificiellement de leur gomme perdent, par là même leur pouvoir pathogène. D'où l'application possible *in vivo* du pouvoir hydrolysant exercé *in vitro* sur la capsule par certains bacilles hémi-cellulosolytiques.

GÉNÉRALITÉS

Au cours de nos recherches nous avons vu combien il peut être difficile au point de vue bactériologique de séparer le Pneumobacille de FRIEDLANDER des *Lactis-aerogenes*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus mucosus capsulatus*, etc. D'accord avec un grand nombre d'auteurs : DENYS et MARTIN (1893), GRIMBERT et LEGROS (1900), nous faisons de toutes ces bactéries un même groupe dont les différentes souches peuvent parfois s'individualiser. Nous les désignons souvent sous le nom de **Pneumobacille**.

Fréquence. Conditions générales de développement.

L'abondance de ces éléments microbiens dans la nature paraît liée à leur peu d'exigence, à la rapidité de leur multiplication ainsi qu'à leur résistance aux variations de température.

Ils se développent en effet aux dépens des milieux les plus variés, parfois très simples. On les rencontre fréquemment dans le *sol* (JAKOWSKY), l'air (PALOWSKY), les *poussières* (ZUCHMIEV) les *eaux*, DIENERT, DUJARRIC DE LA RIVIÈRE ET CHU; Ils en sont souvent un signe de contamination et leur recherche, leur interprétation ont été étudiées par J. DE BARROS BARREBO et G. PACHECO (1928), RUCBHOF KALLAS, BENCHIN et CONLTER (1931), ALLAN GRAG (1932). Ils abondent dans les eaux d'égouts (thèse de GORY 1926).

Dans le *lait*, leur présence n'est pas rare et on les en

isole très souvent : BARTHEL (1932), Irène LIPSKA (1934). Par suite on les rencontre aussi dans les *beurres* GRIMES et HEMERTY (1931). C'est sous le nom de *Lactis aerogenes* qu'il est désigné couramment dans les études sur la flore microbienne du lait.

Louis BARAT¹ en 1916, les a signalés dans des *bières* flamandes suspectes.

Le développement des microbes du groupe du Pneumobacille, très rapide à la température optima de 37°, s'effectue encore à partir de 15° jusqu'à 40°.

Au point de vue du pH la zone qui permet le développement est également très large : l'optimum est 7,5, mais ces bactéries se multiplient bien cependant entre 6 et 8, 5.

Cette très grande abondance dans le milieu extérieur et cette facilité d'adaptation expliquent que ces germes se rencontrent comme des *hôtes normaux* des organismes humains et animaux. Leur siège habituel est l'intestin, (ROGERS, CLARKS ET LUBBS), et on le trouve en outre assez fréquemment chez l'homme sain au niveau des muqueuses respiratoires supérieures : NETTER (1887), le signale dans la salive et les fosses nasales, VON BESSER, Ch. NICOLLE et HÉBERT, BEZANÇON et GRIFFON.

Ne causant parfois aucun trouble, il arrive fréquemment que des éléments possédant une virulence particulière provoquent des accidents graves, quelquefois mortels.

Rôle pathogène.

Le Pneumobacille a fait l'objet de nombreuses études quant à la pathologie et à la thérapeutique des affections qu'il provoque. Dès 1892, NETTER montrait l'importance de ce germe comme agent pathogène.

Il détermine assez souvent des états septicémiques, BANTI (1888) avec ou sans localisation viscérale et souvent aussi des atteintes de l'appareil respiratoire (pneumonie, pleurésie purulente), plus rarement des méningites NETTER (1889) ou des suppurations des voies biliaires. Il est

l'agent d'assez nombreuses infections des voies urinaires (VIALA 1934).

Des bacilles très voisins que nous avons étudiés simultanément sont les agents du **rhinosclérome** de l'ozène ou du **granulome inguinal** (*Calymmatobactérium granulomatis* de BEAUREFAIRE, ARAGAO ET VIANNA, 1912).

Le Pneumobacille existe encore à côté d'autres germes dans les affections les plus diverses. Nous devons ici signaler que ces derniers étant plus fragiles, le Pneumobacille se développe avec une telle intensité qu'il peut arriver à les étouffer.

Cette propriété, a été mise en application par certains thérapeutes. Ceux-ci provoquent artificiellement dans l'organisme contaminé une infection secondaire à Pneumobacille de FRIEDLANDER lequel doit, en se développant, anéantir le microbe visé (application dans le traitement de la diphtérie : GATÉ et PAPACOSTAS 1921, GATÉ 1926).

Le Pneumobacille se rencontre aussi parfois chez les animaux, c'est ainsi que nous avons pu étudier des germes rapportés de Madagascar par le D^r ROBIC, germes ayant causé une épizootie mortelle chez les *cobayes* (mort par septicémie, microbes isolés par hémoculture).

CHAPITRE II

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Les relations de notre laboratoire de l'Institut Pasteur avec de nombreux services hospitaliers, de nombreux centres de recherches, expliquent la grande diversité de nos souches microbiennes dont nous indiquons les origines au tableau I (page 25).

Nous tenons à remercier bien vivement tous ceux qui, en nous faisant parvenir des échantillons bactériens intéressants, voulurent bien nous aider dans ce travail.

Lors des isollements, nous avons retenu les bacilles présentant sur gélose des colonies florissantes, blanches, opaques, *très muqueuses*, filant au contact de l'anse de platine et offrant au microscope l'aspect classique de *bacille capsulé, gram-négatif*, caractéristique du Pneumobacille de Friedlander.

Leur grande vitalité, la rapidité de leur développement en faciliteront l'étude.

Aspect des cultures sur milieux solides.

1° Sur gélose : Nos isollements et repiquages successifs ont été effectués sur des tubes ou des boîtes de gélose simple ou glucosée et les cultures placées ensuite à l'étuve à 37°.

Dans les premières heures, les microbes récemment isolés se développent en colonies blanches, rondes, très saillantes. En vingt-quatre heures la culture a atteint un développement important. Nous devons signaler ici que nous avons toujours obtenu sur gélose glucosée des cultures beaucoup plus muqueuses que celles effectuées dans les mêmes conditions sur gélose simple.

Le glucose semble favoriser la forme *Smooth*, en per-

mettant un développement plus abondant de la substance capsulaire hydrocarbonée.

JULIANELLE (1928) a étudié l'aspect macroscopique du bacille de FRIEDLANDER.

Il en a décrit : 1^o Une forme *Smooth* opaque et deux formes *Rough*.

R¹ : colonies plus petites, transparentes avec un cercle brillant.

R² : plus grosses en touffes de coton.

Au cours de repiquages successifs pendant de longs mois sur un même milieu (gélose simple) nous avons parfois observé une disparition complète de la mucosité des cultures, lesquelles prennent l'aspect sec de cultures typhiques ou colibacillaires : véritable passage de la forme *Smooth* à la forme *Rough* (tels sont en particulier les germes 1-2, *Denf*, *Rémy*).

Une inoculation à l'animal, un nouvel isolement font réapparaître la forme *Smooth* avec son aspect muqueux. Cette forme *Smooth* se conserve bien si on a eu soin de mettre le microbe en gélatine (suivant la technique de Maurice NICOLLE).

Or, nous savons que cette technique est utilisée pour la conservation de la virulence d'une bactérie. Il apparaît donc déjà, comme l'affirme JULIANELLE, que la virulence d'un *Pneumobacille* est étroitement liée à son état morphologique (les formes *Smooth* étant seules virulentes).

Nous avons aussi fréquemment trouvé des colonies microbiennes d'aspect différent dont nous pourrions faire une forme S² : celles-ci montrent un centre muqueux opaque entouré d'une auréole sèche.

Un fait que nous devons signaler aussi, est le suivant : certaines souches telles que : *Chal*, *Ladouffit*, *Honoré*, *Eude*, présentant après repiquage un aspect particulièrement muqueux, au bout de cinq à six jours deviennent transparentes puis coulantes et meurent ensuite rapidement.

Ces phénomènes d'autolyse, observés également par le D^r DUJARDIN-BEAUMETZ qui nous en a fait part au cours

d'une conversation, entraînent la nécessité, pour la conservation de la bactérie, de fréquents repiquages. En gélatine à basse température elle garde toute sa vitalité.

Enfin les auteurs s'accordent pour considérer le *Pneumobacille* comme un germe achromogène. On verra ultérieurement que nous signalons et étudions l'apparition de certains pigments dans les cultures primitivement incolores.

Un aspect pigmenté des colonies microbiennes ne pourrait donc faire rejeter définitivement l'hypothèse de *Pneumobacille*.

2° **Sur pomme de terre** : C'est en culture sur pomme de terre que cette pigmentation apparaît avec son maximum de netteté.

Les souches achromogènes se développent également très bien sur ce milieu en donnant un enduit grisâtre, épais et visqueux.

3° **Sur sérum coagulé** : Le sérum coagulé, permet également le développement de ces germes, mais ils n'y présentent pas d'aspect particulier.

4° **En gélatine** : Ensemencées par piqûre en gélatine, ces bactéries se multiplient en formant un clou à tête étalée à la surface du tube, tantôt saillante, tantôt aplatie. Cet aspect déjà signalé par FRIEDLANDER en 1883, est un des bons éléments d'identification microbiologique.

Aspect des cultures sur milieux liquides.

Les milieux liquides que nous avons utilisés pour nos recherches sont le *bouillon Martin simple* et le *milieu T* (Truche) dont nous rappelons la composition et la préparation.

Peptone Chapotaut	40 g.
Cl Na.	5
Eau q. s. p.	1.000 cc.

Stériliser à 120° pendant 20 min., filtrer.

Ajouter 2 grammes de glucose.

Amener au Ph 7,5.

Répartir et stériliser à nouveau à 110° pendant quinze minutes.

Nos souchesensemencées sur ces milieux à partir de cultures fraîches sur gélose nous ont donné dans les premières heures d'étuve un trouble du bouillon. Ce trouble s'accroît rapidement en même temps que se développe une *épaisse collerette*, apparaissant au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures. Après quelques jours la collerette disparaît et tombe au fond du tube en même temps que la culture devient de plus en plus visqueuse et filante.

Nous avons pu constater l'absence totale de collerette chez les germes 459, N. et la présence d'un voile très léger dans les cultures PL. 516, PP³ et FRIED 33.

Une *grande surface d'aération* de la culture facilite le développement de ces germes essentiellement aérobie. C'est pourquoi, dans des recherches ultérieures, nous aurons soin de répartir nos milieux synthétiques liquides en petites fioles coniques d'Erlenmeyer, et en quantités suffisantes pour que la surface du liquide occupe la partie la plus large de la fiole.

Nous n'avons jamais observé de voile sur de telles cultures : un trouble du milieu, un dépôt au fond de la fiole les caractérisent.

Aspect microscopique des germes.

1° A l'état vivant : Examinée entre lame et lamelle une culture de Pneumobacille présente un ensemble de germes *immobiles*, petits bâtonnets hyalins offrant souvent une grande inégalité de dimensions : leur longueur varie généralement de $0\ \mu\ 5$ à $3\ \mu$; leur largeur de $0\ \mu\ 2$ à $1\ \mu\ 5$ mais certains éléments peuvent exceptionnellement sortir de ces limites.

Type des bactéries capsulées, cette immobilité lui est attribuée comme un caractère classique et le distingue des autres bacilles du groupe Coli-Typhique, ciliés et par suite plus ou moins mobiles. A l'examen direct la cap-

sule n'est généralement pas apparente ; elle se manifeste parfois par un halo légèrement plus réfringent autour du corps microbien.

Nous avons examiné toutes nos souches microbiennes entre lame et lamelle, en cultures liquides très jeunes : 3 à 6 heures. Nous avons eu la surprise de trouver 5 germes *Rémy, P. L., 4474, 1684 et 516* qui à un certain moment de leur existence présentèrent une **mobilité très nette**.

Ces mêmes cultures examinées au bout de 24 heures d'étuve devenaient parfaitement immobiles.

Nous avons alors pensé que certaines bactéries capsulées et immobiles pouvaient dans les premières heures de culture être munies de **cils fragiles et caducs** leur conférant une mobilité passagère.

Avec le concours de M. LEVENSON du laboratoire du Dr WEINBERG nous avons pratiqué sur ces bactéries une coloration destinée à mettre les cils en évidence.

Voici la méthode très délicate qui a été mise en pratique par le Dr LEVENSON, et qu'il avait lui-même mise au point en étudiant le *Bacillus bifermentans* lequel, immobile en culture de 24 heures, présente une mobilité nette en culture de 8 heures.

Cette méthode exposée à la Société de Biologie le 18 janvier 1936 est la suivante : imprégnation à l'argent des préparations mordancées par la solution Casares-Gil.

Une culture liquide de 4 à 5 heures, en eau peptonée est diluée très fortement (1 goutte pour 8 environ) dans du sérum physiologique. On étale, sèche, mordance à froid pendant 2 minutes par le mordant Casares-Gil, lave, recouvre de nitrate d'argent ammoniacal qu'on chauffe jusqu'à émission de vapeurs blanches. On lave à nouveau et sèche.

Nous trouverons les détails de cette technique très sensible dans les Annales de l'I. P., Juin 1936.

Par ce procédé les germes *P. L., 1684, 4474 et 516* examinés se montrèrent munis de cils péritriches très

finis dont nous reproduisons un aspect caractéristique à la fin de cet ouvrage planche I, fig. II (coloration effectuée par M. LEVENSON lui-même. Photographie de M. JEANTET à l'Institut Pasteur).

Au bout de 24 heures ces cils sont tombés et les bacilles ont repris leur aspect normal.

2° **Après fixation et coloration :** Le Pneumobacille et les germes du même groupe se colorent aisément par tous les colorants usuels acides ou basiques. Ils sont Gram-négatifs et montrent après coloration une grande irrégularité de formes et de dimensions. Leur longueur moyenne est de $1\ \mu\ 5$ et la largeur $0\ \mu\ 5$, mais les échantillons microbiens peuvent se montrer très différents les uns des autres.

ETUDE DU CORPS MICROBIEN. — Sur une même préparation d'une culture pure on rencontre souvent, à côté de germes presque cocciformes, des bacilles allongés, tantôt minces, tantôt épais. L'association en diplobacilles est fréquente et il n'est pas rare de rencontrer de véritables chainettes microbiennes.

On sait que, sur les préparations de Coli-bacilles et de Paratyphiques B, il est classique d'observer des formes à **coloration bipolaire** très nette. Ce même aspect bipolaire est signalé dans les préparations de Pneumobacilles de FRIEDLANDER obtenues avec des frottis d'organes infectés.

Mais, fait intéressant, nous avons pu assez fréquemment le mettre en évidence dans des préparations obtenues à partir de cultures pures, et même dans des éléments courts et trapus.

Ce résultat a été particulièrement net avec une coloration au bleu polychrome ou à la fuschine de Ziehl après fixation à l'acide acétique au 1/100^e.

Nous reproduisons sur la planche I, (fig. III) des aspects très caractéristiques observés au cours des examens microscopiques.

Nous avons rencontré certaines souches particulière-

ment filamenteuses. Les éléments les plus allongés présentent cette même coloration bipolaire et en plus, sont marqués d'une série de taches sombres, lesquelles semblent indiquer les endroits où se coupera le filament pour donner naissance à des éléments microbiens plus courts, disposés d'abord en chainettes, ensuite vraisemblablement isolés.

ETUDE DE LA CAPSULE. — Ces mêmes colorations simples nous ont permis souvent de mettre nettement en évidence la capsule classique du Pneumobacille de FRIEDLANDER, capsule se limitant tantôt à un seul bacille, tantôt enfermant 2 ou plusieurs corps microbiens.

Nous continuerons, pour être d'accord avec les auteurs et vu la commodité de ce terme, à employer le mot de « capsule », bien qu'il nous paraisse impropre en réalité.

Il implique en effet la conception d'un espace vide autour du corps microbien. Or, nous savons maintenant que cette capsule est une sécrétion gommeuse ; l'espace vide n'existe pas et il vaudrait mieux substituer à ce terme l'appellation plus précise d'*enveloppe gommeuse périmicrobienne*.

L'important travail de BORIN (1925) nous a apporté de précieux documents pour l'étude de cette enveloppe.

Les meilleures préparations furent obtenues lors des isollements de germes, ou sur les frottis d'organes d'animaux récemment inoculés. Les épanchements péritonéaux et les frottis de rate surtout, ont permis des préparations remarquables. Nous en reproduisons un joli aspect planche I, fig. I.

Avec les cultures sur milieux synthétiques, nous n'avons jamais pu mettre la capsule en évidence. Mais *in vivo* et dans les milieux usuels tous les bacilles dont nous poursuivons l'étude se sont montrés capsulés.

Au cours des repiquages successifs la capsule peut s'atrophier ou même disparaître (JULIANELLE) en même temps qu'apparaissent les formes *Rough*. Un passage sur animal suffit à recapsuler les germes.

PLANCHE I

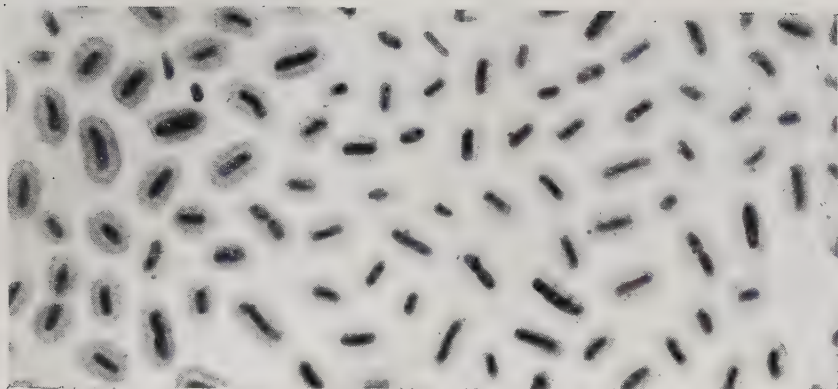


FIG. 1. — Capsules. Souche S7. Péritonite expérimentale du cobaye. Frottis coloré à la thionine phéniquée.

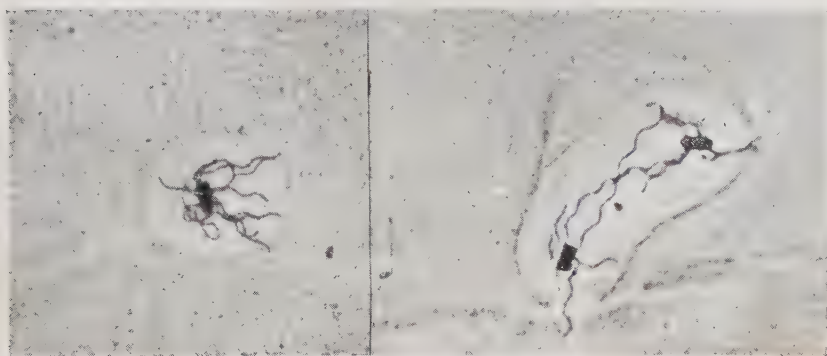


FIG. 2. — Cils. Souche 516. Culture de 5 heures en eau peptonée. Préparation de M. Levenson.



FIG. 3. — Coloration bipolaire. Souche 720. Coloration à la fuschine de Ziehl après fixation à l'acide acétique au 1/100.

Grossissements 1850. Photos JEANTET. I. P.

Les colorations que nous avons utilisées dans cette épreuve furent d'abord le bleu de méthylène et le Gram qui suffisent lorsque le bacille est fortement capsulé.

La technique à l'encre de chine de BORIN nous permet d'obtenir quelques jolies préparations ; elle a le tort d'être assez inconstante.

Mais nous avons surtout utilisé une méthode très simple de coloration à la *thionine phéniquée* : après fixation à l'alcool, un contact de 15 minutes avec le colorant suivi d'un lavage abondant à l'eau distillée constitue une bonne méthode de coloration de la capsule.

Des techniques utilisant le *violet de gentiane aniliné*, l'*éosine*, l'*association du bleu polychrome et de l'orcéine* font en ce moment l'objet d'une mise au point au laboratoire.

La nature et le rôle de cette capsule ont fait l'objet de recherches importantes. BORIN dans sa thèse lui attribue la composition suivante :

Galactanes.....	8 %
Eau	92 %

Ce sont les travaux de HAMM (1907) et surtout ceux de TOENNIESSEN (1921) qui ont ouvert la voie à l'étude biochimique de cette question, montrant qu'à la conception d'une capsule muqueuse il fallait substituer celle d'une gomme hydrocarbonée de composition définie et en particulier exempte d'azote.

Ces données ont été confirmées par une série de travaux ultérieurs.

Elles ont servi de base à des recherches immunochimiques très importantes poursuivies par la fondation ROCKFELLER concurremment avec des expériences du même ordre sur les Pneumocoques ; sans être, à proprement parler un antigène, c'est un réactif spécifique du groupe microbien, et les solutions de ces substances hydrocarbonées précipitent en présence de sérums correspondants à des dilutions extrêmement faibles.

D'autre part il est possible de « décapsuler » ces ger-

mes par une série de procédés chimiques ou biologiques agissant, soit *in vitro* soit même *in vivo*.

De ces agents reconnus décapsulants le plus intéressant est une bactérie isolée de la tourbe et produisant, grâce à une diastase particulière la digestion de substances héli-cellulosiques ; les cultures filtrées de cette bactérie contiennent ce principe hydrolysant qui a même pu être appliqué au traitement de l'infection expérimentale à Pneumobacille (DUBOS et AVERY 1931).

Nous même avons utilisé fréquemment au laboratoire, pour décapsuler des bactéries en émulsion dans du sérum physiologique une méthode due à PORGES, utilisant pour l'hydrolyse des gommés l'acide chlorhydrique normal.

Un contact de 5 minutes à l'ébullition, de 10 cc. d'émulsion avec 4 gouttes d'acide chlorhydrique normal suffit pour décapsuler les bactéries. Après neutralisation par la soude normale l'émulsion décapsulée est utilisée pour des épreuves d'agglutination. Méthode NICOLLE, JOUAN et DEBAINS 1918).

ORIGINE. CARACTÈRES GÉNÉRAUX

TABLEAU I

Noms	Origine	Collerette	Mobilité 3 h.	Mobilité 6 h.	Mobilité 24 h.
1	D ^r Huri (Urine)	+	—	—	—
2	<i>id.</i>	+	—	—	—
Rémy	D ^r Viala (Urine)	+	++	+	—
Eude	Urine	+	—	—	—
Beauv.	D ^r Beauvy (Urine)	+	—	—	—
Janv.	D ^r Demanche (Urine)	+	—	—	—
Suberville	D ^r Lavergne (H. D.)	+	—	—	—
SP	Collection M. Le grouw I. P.	+	—	—	—
Denf		+	—	—	—
Chal		+	—	—	—
P. L.		+ _ε	++	—	—
672	Inst. Lister Londres	+	—	—	—
2.794	<i>id.</i>	+	—	—	—
2.651	<i>id.</i>	+	—	—	—
243	<i>id.</i>	+	—	—	—
418	<i>id.</i>	+	—	—	—
4.140	<i>id.</i>	+	—	—	—
2.926	<i>id.</i>	+	—	—	—
3.279	<i>id.</i>	+	—	—	—
99	<i>id.</i>	+	—	—	—
4 474		+	++	+	—
L ₂₄	D ^r Névoit (Lait)	+	—	—	—
P. P ₃	Préf. Police (Lait)	+ _ε	—	—	—
P. P ₄	<i>id.</i>	+	—	—	—
720	M ^{me} Aitoff. Collection du D ^r De- bat, Garches	+	—	—	—
516		+	++	+	—
1.383		+	—	—	—
1.642		+	—	—	—
1.684		+	++	++	—
Mad S ₇	D ^r Robie	+	—	—	—
S ₄	Epizootie, cobayes à Madagascar	+	—	—	—
" S ₆		+	—	—	—
" S ₃		+	—	—	—
" S ₂		+	—	—	—
Fried. 33	D ^r Rochaix (Lyon)	+ _ε	—	—	—
Honoré	Pleurésie purulente	+	—	—	—
Gran	Granulome inguinal	+	—	—	—
Ladouffit	Hôp. S ^t -Antoine	+	—	—	—
N	Mucus nasal (Beaujon)	—	—	—	—
Brunet	<i>id.</i>	+	—	—	—
1.926	Rhinosclérome (Londres)	+	—	—	—
459	Ozène (Londres)	—	—	—	—

+_ε = présence d'une collerette peu développée.
 + = Mobilité de tous les éléments.
 + = Mobilité de certains éléments.

CHAPITRE III

ÉTUDE BIOCHIMIQUE

Dans ce chapitre, nous allons étudier certains points de la nutrition azotée et carbonée des bactéries précédemment nommées, *muqueuses en cultures sur milieux solides, immobiles en cultures liquides de 24 heures, gram-négatifs, capsulées.*

Nous allons voir combien il peut être difficile d'établir dans ce groupe de bacilles un type microbien absolu. Nous nous trouvons en présence d'une très grande famille de germes étroitement unis par certaines propriétés, mais conservant souvent leur individualité par quelques caractères différents des caractères typiques classiques.

Nous avons eu l'occasion d'observer chez un même microbe des transformations que nous exposons au chapitre suivant : fait qui vient encore ajouter à la complexité de la question.

Un grand nombre d'auteurs ont essayé d'établir des distinctions en se basant sur quelques caractères, quelques propriétés biochimiques. Nous les citerons au cours de ce travail.

Pour la culture en milieux synthétiques nous avons utilisé la technique indiquée par BRAUN et ses collaborateurs (1921) pour des germes du groupe Coli-Typhique, c'est-à-dire : ensemencement à partir d'une culture sur gélose et résultat noté seulement au 3^e repiquage, pour éviter toute intervention de substance étrangère au milieu utilisé.

De plus les germes, étant très fortement aérobies, les cultures ont été effectuées en petites fioles d'ERLENMEYER où le milieu était réparti par fractions de 20 cc. envi-

ron afin que sa surface occupât la partie la plus large de la fiole.

La concentration saline des milieux synthétiques utilisés a toujours été la suivante :

Chlorure de sodium.	5 gr.
Sulfate de magnésium	0 gr.2
Phosphate bi-potassique	1 gr.

Donnée par KOSER, elle apporte aux bacilles muqueux les éléments minéraux utiles à leur développement.

A ces éléments minéraux nous avons ajouté les corps azotés et carbonés nécessaires à la croissance des microbes et dont nous voulions étudier le métabolisme de l'assimilation. Le pH des milieux fut toujours le pH optimum 7,5.

Nous avons envisagé successivement :

1° La nutrition azotée.

2° La nutrition carbonée.

I. — NUTRITION AZOTÉE

Utilisation de l'azote ammoniacal.

M. LÉVY-BRUHL et M^{me} LEGRAND en 1930 ont obtenu des cultures abondantes de *Pneumobacilles* sur des milieux contenant comme seul élément azoté, en présence de glucose élément carboné : du chlorure d'ammonium, du sulfate d'ammonium, ou du nitrate d'ammonium.

De même les sels d'ammonium des acides organiques (succinates, citrates) se sont montrés d'assimilation facile pour la plupart des bactéries muqueuses.

Nous n'avons pas approfondi cette étude, mais tous nos milieux synthétiques dans l'étude de la nutrition azotée contiennent comme seul élément azoté du *phosphate diammonique* $PO^4H(NH^4)^2$, et sous cette forme l'azote s'est encore montré très facilement assimilable.

Il semble donc que l'ion ammoniacque soit très favo-

nable à la synthèse du corps microbien lui-même puisqu'il en permet une multiplication rapide.

Utilisation de l'urée.

Il a été établi que l'urée $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ peut constituer une source d'azote pour un assez grand nombre de bactéries.

Nous nous sommes posé la question de son utilisation :

1° *comme aliment azoté en présence d'un élément carboné facilement assimilable*, tel que le glucose ou

2° *à la fois comme aliment azoté et carboné.*

Pour réaliser cette épreuve nous avons préparé les 2 milieux suivants :

A) Urée.	3 gr.		B) Urée.	6 gr.
Glucose	5 gr.	et	$\text{PO}_4 \text{HK}^2$	1
$\text{PO}_4 \text{HK}^2$	1		Cl Na.	5
Cl Na	5		$\text{SO}_4 \text{Mg}$	0,2
$\text{SO}_4 \text{Mg}$	0,2			

amenés à un pH 7,5, stérilisés par 3 chauffages à 100° après répartition en fioles d'Erlenmeyer.

Les ensemencements furent pratiqués à partir de cultures sur gélose et les fioles placées à l'étuve à 37°.

Dès le premier jour le milieu A nous a permis d'obtenir des cultures abondantes. Le milieu B au contraire n'a fourni aucune récolte.

Les cultures sur le milieu contenant urée et glucose étaient accompagnées d'abord d'un abaissement considérable du pH, qui atteignait 4, 5 et même 4. Puis au bout de quarante-huit heures on constatait une alcalinisation forte ; le pH remontait à 8, 5, même 9 et s'y maintenait.

Il est vraisemblable que la première phase correspond à la fermentation du glucose et que l'alcalinisation secondaire est due à la formation de sels ammoniacaux résultant de la décomposition de l'urée (carbonate d' NH_3).

L'urée source à la fois d'azote et de carbone ne permet

pas le développement microbien. Elle ne semble donc pas apporter le carbone sous une forme assimilable.

Utilisation des acides aminés.

M. LEVY-BRUHL (1930) a étudié l'utilisation d'une série d'acides aminés par ces germes muqueux. Il a obtenu des cultures très abondantes dans des milieux contenant comme source d'azote : le *glycocolle* et les *acides mono, di, tri, tétra-aminés, proline, phénylalanine, glucosamine*. A part le glycocolle, ces composés peuvent servir également de sources de carbone et assurer à eux seuls (avec addition de phosphore) le développement du microbe.

Nous trouvons rapportées dans l'ouvrage de STEPHENSON les transformations possibles des amino-acides $R \cdot CHNH^2 \cdot COOH$ sous l'effet des bactéries. Celles-ci semblent capables de provoquer soit une désamination soit une décarboxylation ; nous poursuivons cette étude.

Décarboxylation de l'histidine.

Un point particulièrement intéressant dans l'étude des cultures en milieux aminés semble être l'assimilation de l'*histidine* et sa transformation en *histamine*, dont on connaît les effets toxiques.

Dans leurs recherches très suggestives sur cette transformation BERTHELOT A., et D. M. BERTRAND montraient, dès 1912, les effets sur l'histidine d'une souche microbienne dénommée par eux *Bacillus aminophilus intestinalis* et que ses caractères rapprochent beaucoup des *Pneumobacilles*.

HANKE, M. T. et K. K. KÖSSLER ont repris en 1922 cette question et ont obtenu des résultats positifs avec des *Colibacilles*, 1 souche sur 5 de *B. aerogenes* et 1 sur 12 de *B. acidilactici* (bacilles du groupe que nous étudions). Ces auteurs signalent de plus que les organismes donnant des résultats négatifs, peuvent cependant attaquer l'histidine qu'ils décomposent suivant une autre méthode.

Nous-même, au cours d'expériences sur la toxine soluble, (expériences que nous rapportons ultérieurement) avons pensé nous trouver en présence d'une formation d'histamine *in vitro*.

Les recherches entreprises pour mettre ce produit en évidence ont échoué.

Utilisation du noyau tryptophane des peptones.

Production d'indol. — Une excellente source d'azote est constituée par les peptones qui en même temps fournissent à la bactérie le carbone qui lui est nécessaire.

L'utilisation des peptones s'accompagne dans certains cas d'une attaque de leur noyau tryptophane laquelle conduit à la production d'indol. (HOPKINS et COLE, 1903).

Or un des caractères du *Pneumobacille*, qui lui est commun avec les bacilles Typhiques et Paratyphiques, mais qui l'oppose au *Coli-bacille* est qu'il ne possède pas la propriété de former de l'indol aux dépens des peptones.

Certains auteurs ont cependant signalé des souches de *Pneumobacille indologènes* (TITSLER-1935).

Nous mêmes avons contrôlé cette propriété. Nous avons cultivé nos bacilles en eau peptonée à 2 p. 1000 et effectué la réaction d'*Ehrlich* (nitrite de soude + acide sulfurique), après un séjour de 3 ou 4 jours des cultures à l'étuve.

La formation d'indol était décelée par agitation avec de l'alcool amylique, lequel pour 2 souches : le 672 de Londres et le 459 bacille de l'Ozène prit une coloration rouge très nette.

D'accord avec les auteurs précédemment cités nous pouvons donc conclure qu'il existe une proportion de 4 à 5 % de bacilles du groupe *Lactis-aerogenes* capables de donner de l'indol aux dépens des peptones.

Utilisation du noyau soufré des protéines.

Epreuve du plomb : Cette épreuve qui constitue un élément diagnostique important dans le groupe *Coli-Typhi-*

que ne semble pas avoir été étudiée pour le groupe *Coli-Lactis-aerogenes*.

Nous l'avons effectuée en utilisant la technique de l'ensemencement en stries le long du verre, en des milieux gélosés contenant 0, 5 % de Plomb sous forme de sous-acétate. Nous avons opéré en l'absence totale de sucre car nous savons que celui-ci réduit au minimum l'attaque de la matière protéique.

La bactérie attaque le noyau cystine de cette dernière en produisant de l'hydrogène sulfuré, lequel est mis en évidence par le noircissement du Plomb, le long des stries d'ensemencement.

Les souches 672, 2.794, *P. P₃* nous ont montré un très beau noircissement des stries au bout de 24 heures d'étuve.

En prolongeant l'expérience nous avons obtenu un résultat analogue avec un assez grand nombre de souches, mais ce noircissement tardif qui se produit aussi avec certaines souches de Coli-bacille ne présente pas la même valeur.

Nous avons opéré en tubes non capuchonnés le soufre du caoutchouc pouvant fausser les résultats en provoquant le noircissement de la gélose.

Ce nouveau caractère rapprocherait donc certains FRIEDLANDER des bacilles Typhiques et Para-Typhiques B.

Épreuve de la gélatine.

Clou. Nous avons systématiquement effectué pour toutes nos souches l'ensemencement classique par piqure en gélatine, donné par FRIEDLANDER lui-même (1883). Pour tous les auteurs le *clou caractéristique* que donne le Pneumobacille est un bon élément diagnostique pour le différencier des Colibacilles, des bacilles Typhiques et Paratyphiques, en même temps que l'absence de liquéfaction permet la distinction d'avec le *Proteus* germe essentiellement gélatinolytique.

Nos cultures abandonnées à la température du labo-

ratoire nous ont donné de très beaux clous au bout de quatre à six jours, les uns à tête globuleuse, les autres à tête plate s'étalant à la surface du milieu.

Pour 13 de nos souches, cette formation fut accompagnée d'un dégagement gazeux abondant restant parfois emprisonné dans la gélatine, d'autres fois s'échappant en fragmentant cette dernière.

Seul le germe 1926, *bacille du Rhinosclérome* ne nous a jamais donné de clou en gélatine.

Liquéfaction. Dans nos premières expériences, nous avons au cours de cette épreuve relevé un fait intéressant et qui confirme les observations rapportées par M. LEGROUX de l'Institut Pasteur dans sa leçon sur le Pneumobacille en janvier 1935 : 2 de nos souches, Rémy et 1684 ont *liquéfié la gélatine* (la première en 18 jours, la deuxième au bout de 30 jours), après avoir donné un clou.

La présence d'une gélatinase se manifestant tardivement chez certains FRIEDLANDER semble un fait nouveau.

Ce caractère qui les rapproche du *Bacillus Proteus* peut s'*acquérir* après de nombreux repiquages. C'est ainsi que nous avons eu l'occasion de l'observer récemment chez des souches primitivement non protéolytiques et conservées au laboratoire depuis trois ans. Ce fait constitue une véritable évolution du bacille et nous y reviendrons au chapitre suivant.

Ce pouvoir protéolytique faible et tardif n'a jamais été observé à l'égard du *sérum coagulé*, milieu sur lequel les cultures sont abondantes mais ne présentent aucune trace de liquéfaction.

On peut donc se demander avec STEPHENSON (p. 185) s'il s'agit d'une action protéasique vraie. Ceci ne pourrait être affirmé que par la constatation de l'apparition de produits abiurétiques dans la gélatine sous l'action du microbe.

Réduction des nitrates : Utilisation de l'azote nitrique.

Dans son travail sur le Pneumobacille, le professeur LEMIERRE s'appuyant sur les travaux de GRIMBERT relate la propriété que possède ce bacille d'utiliser les nitrates pour les *réduire en nitrites* (cette transformation s'accompagnant ou non d'un dégagement gazeux d'azote).

Le milieu que nous avons utilisé est une solution à 1 % de nitrate de potassium dans une eau peptonée à 1 % à un pH 7,5.

Après répartition dans des tubes à cloches il fut stérilisé à 120° pendant un quart d'heure.

Les tubesensemencés à partir de cultures fraîches sur gélose furent mis à l'étuve à 37° et les résultats notés au bout de cinq jours.

Toutes nos souches, sauf le Eude, nous donnèrent une culture abondante. Un léger dégagement gazeux fut noté dans des tubes 1, 2, Denf, 720, 2651. Un dégagement important eu lieu en 418.

Dans chaque tube de culture nous avons recherché les nitrites par le réactif de TROMSDORFF dont nous rappelons la composition :

Chlorure de zinc pur.	20 gr.
Iodure —	2 —
Amidon soluble	4 —
Eau distillée q. s. p.	1.000 cc.

A 10 centimètres cubes de culture nous avons ajouté 0 cc. 5 de réactif et V gouttes d'acide sulfurique. En présence de traces de nitrites seulement nous savons qu'il donne une superbe coloration bleue.

Pour le germe 418 cette réaction fut négative, mais l'abondant dégagement gazeux dans la cloche nous permit de penser que les nitrates ont été brusquement réduits *en azote*.

Les souches *Ladouffit*, *Suberville* nous donnèrent une culture, mais ni nitrites, ni gaz.

Donc, si nous faisons le bilan de cette épreuve sur 42 germes d'une même famille.

- 1 ne donne aucune culture : toxicité du nitrate.
- 3 poussent sans toucher au nitrate.
- 1 transforme brusquement le nitrate en azote.
- 5 donnent à la fois de l'azote et des nitrites.
- 32 donnent seulement des nitrites.

Le *Pneumobacille* manifeste donc ici un pouvoir réducteur net mais d'intensité variable vis-à-vis des nitrates.

Dans le milieu précédent le sel azoté se trouve à côté d'une autre source d'azote : la peptone.

Il serait intéressant de savoir si le nitrate de potassium seul peut être capable de servir d'élément azoté à la bactérie. Les essais effectués jusqu'à présent nous ont donné des résultats négatifs. L'azote nitrique ne nous paraît pas être directement assimilable. Sur quelques bactéries mêmes, nous avons vu précédemment qu'il peut avoir un effet toxique.

Nous résumons dans le tableau suivant les faits principaux de l'étude biochimique précédente.

Noms	Inulol en eau peptonée	Clou en gélatine	Noircissement du Plomb	Réduction des Nitrates	
				Nitr les	Azote
1	—	+	—	+	ε
2	—	+	—	+	ε
Rémy	—	+ liq. — faction en 18 j.	—	+	—
Eude	—	+	—	—	ne pousse pas
Beauv.	—	+	—	+	—
Janv.	—	+	—	+	—
Suberville	—	+	—	+	—
SP	—	+	—	+	—
Denf	—	+	—	+	ε
Chal	—	+	—	+	—
P. L.	—	+	—	+	—
672	—	+	+	+	—
2.794	—	+	+	+	—
2.651	—	+	—	+	ε
243	—	+	—	+	—
418	—	+	—	+	—
4.140	—	+	—	+	—
2.926	—	+	—	+	—
3.279	—	+	—	+	—
99	—	+	—	+	—
4.474	—	+	—	+	—
L24	—	+	—	+	—
P. P ₃	—	+	—	+	—
P. P ₄	—	+	—	+	—
720	—	—	—	+	ε
516	—	+	—	+	—
1.383	—	+	—	+	—
1.642	—	+	—	+	—
1.684	—	+ liq. — faction 30 j	—	+	—
Mad S7	—	+	—	—	—
" S4	—	+	—	—	—
" S6	—	+	—	+	—
" S3	—	+	—	+	—
" S2	—	+	—	+	—
Fried. 33	—	+	—	+	—
Honoré	—	+	—	+	—
Gran	—	+	—	+	—
Ladouffit	—	+	—	—	—
N	—	+	—	—	—
Brunet	—	+	—	—	—
1.926	—	—	—	+	—
459	+	+	—	—	—

ε : faible dégagement gazeux dans la cloche.

II. — *NUTRITION CARBONÉE*

La nutrition carbonée de tous ces germes muqueux pose également une série de problèmes fort intéressants.

La chimie organique offre en effet pour l'accomplissement de la synthèse du corps microbien une infinité de sources de carbone plus ou moins complexes. Les unes : acides organiques (sous forme de sels), sucres, alcools, apportent seulement l'élément carboné, les autres amino-acides, amines, urée, déjà étudiés apportent à la fois le carbone et l'azote nécessaires à la vie microbienne.

Pour l'étude de l'assimilation des premières le milieu de culture contiendra à côté du corps carboné, un élément azoté minéral ; au cours de ces recherches c'est le phosphate diammonique que nous avons utilisé à cette fin.

Utilisation des sels d'acides organiques comme source unique de carbone.

Dans cette étude nous avons toujours employé le sel de sodium de l'acide envisagé.

1° *Les carbonates* se sont montrés inutilisables pour tous les bacilles du groupe *Lactis aerogenes*. Le nombre de germes qui peuvent les assimiler est d'ailleurs extrêmement restreint.

2° *Les formiates* ne nous ont permis aucune culture. On sait d'ailleurs que l'acide formique exerce parfois sur les bactéries un effet toxique comme sur les organismes de la série animale ; cependant dans le groupe coli-typhique leur assimilation donne lieu à des études intéressantes.

3° *Les acétates* au contraire nous ont permis une étude plus fructueuse. Ils se montrent très facilement assimilables par certaines de nos souches ; c'est pourquoi nous avons cherché à approfondir l'étude du métabolisme de leur utilisation.

Les bactéries capables d'utiliser l'acide acétique comme source unique de Carbone sont peu nombreuses.

En 1903 BROWNE avait montré que des bactéries assimilant l'alcool pouvaient, en l'absence d'alcool utiliser l'acide acétique.

Cependant en 1906 WINSLOW et LOCKRIDGE démontraient la toxicité de l'ion acétique pour certaines cellules.

Mais AYERS, REPP et JOHNSON en 1919 trouvèrent que 68 cultures capables d'alcaliniser le lait étaient capables d'oxyder l'acétate de soude en milieu synthétique avec développement d'une réaction alcaline.

D'après KOSER en 1923, dans le groupe *Aerogenes* 49 souches sur 50 assimilent l'acétate.

DE JONG en 1926 signale le *Bacterium aerogenes* comme un germe capable de se développer sur acétate en produisant une alcalinisation du milieu.

En 1932 LWOFF (A) montre que l'acétate de sodium peut de même servir d'aliment carboné à certains protozoaires.

Personnellement nous avons d'abord recherché *combien* de souches parmi celles de notre collection pouvaient pratiquer cette utilisation.

A cet effet nous avons préparé le milieu suivant :

Cl Na	5 gr.
SO ⁴ Mg.	0,2 gr.
PO ⁴ H K ²	1 gr.
PO ⁴ H (NH ⁴) ²	1 gr.
CH ³ CO ² Na 3 H ² O	10 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

Amené au pH 7,5, il était ensuite réparti après filtration en petites fioles d'ERLEMEYER par fractions de 20 cc. environ et stérilisé 15 minutes à 120°.

Nos 42 souches furent systématiquement ensemencées sur ce milieu à partir de cultures fraîches sur gélose.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Au bout de 24 heures d'étuve à 37° : 7 de nos germes donnent une culture.

Au bout de 3 jours d'étuve à 37° : 21 résultats positifs.

Au bout de 10 jours d'étuve à 37° : 23 résultats positifs.

Cette épreuve ne peut donc pas être considérée comme spécifique du Pneumobacille, mais elle offre un intérêt théorique incontestable car l'acétate de soude, seul élément carboné, substance relativement simple se prêtant si bien à la synthèse de corps microbien se montre particulièrement favorable aux études de métabolisme et de bilan carboné.

Le Pneumobacille agit ici comme un *ferment oxydant* extrêmement actif.

Au bout de 24 heures dans les fioles où s'effectue un développement microbien, nous constatons une **élévation** sensible du **p H**. Le 3^e jour celui-ci atteint déjà 9, puis il monte ensuite le 5^e et 6^e jour à 9, 5 et même 10 où il se maintient encore pendant des semaines, voire même des mois. En même temps cependant on note une abondante récolte microbienne et les germes se maintiennent vivants malgré la grande alcalinité du milieu.

Pour approfondir le métabolisme de l'utilisation de l'acétate nous avons choisi la souche S₇, qui nous a donné les cultures les plus riches et une précoce et violente alcalinisation du milieu : en 24 heures le pH passe en effet de 7,5 à 8,5. Au 6^e jour il est 9,5, au 8^e jour 9,8 où il se maintient ensuite.

Nous avons étudié successivement :

- 1^o avec quelle **rapidité** se fait l'utilisation de l'acétate ;
- 2^o en **quelles proportions** il est consommé par le microbe ;

3^o **quels produits** résultent de sa transformation.

1^o **RECHERCHES QUANTITATIVES** : Nous avons effectué deux séries d'expériences. Le milieu acétaté fut réparti dans des fioles d'ERLEMEYER de 250 cc. Pour la 1^{re} série elles contenaient chacune 50 cc. de milieu ; pour la 2^e série elles en contenaient chacune 100 cc.

Après une stérilisation de 15 min. à 120°, elles furent ensemencées à partir d'une culture de 24 heures sur gélose et placées à l'étuve à 37°. Toutes donnèrent dès le premier jour une abondante culture.

Par la méthode de DUCLAUX, nous avons d'abord dosé exactement l'acide acétique dans le milieu primitif, et nous avons ensuite évalué chaque jour la *quantité de carbone utilisé par les bactéries*.

Nous rappelons le *principe* et la *technique* de la méthode suivie :

Principe. — Elle consiste à déplacer de sa combinaison sodée par un autre acide non volatil (acide tartrique de préférence), l'acide acétique combiné. Celui-ci est isolé par une distillation rapide et dosé volumétriquement dans le distillat recueilli par fractions de 10 cc. Le résultat total représente alors 80 % de l'acide contenu dans le milieu initial.

Technique. — Notre premier dosage fut effectué sur 100 cc. du milieu primitif amenés à 110 par addition de 10 cc d'eau. Après avoir ajouté un léger excès d'acide tartrique nous avons distillé 100 cc. du mélange précédent et dosé l'acide par la soude N/20 en présence de rouge de méthyle comme indicateur.

10 cc. du distillat. furent neutralisés par	8 cc. 45 de OH Na N/20.
20 cc. — — —	17 cc. 7
30 cc. — — —	26 cc.
40 cc. — — —	35 cc. 5
50 cc. — — —	46 cc. 3
60 cc. — — —	58 cc. 1
70 cc. — — —	68 cc. 95
80 cc. — — —	81 cc. 35
90 cc. — — —	92 cc. 6
100 cc. — — —	109 cc. 35

Puisque 80 % seulement de l'acide acétique passent à la distillation la quantité totale d'acide contenue dans les 100 cc. de milieu primitif correspondait à :

$$\frac{109.36 \times 100}{80} = 136,7 \text{ cc. de OH Na N/20.}$$

Soit à :

$$\frac{136,70 \times 60}{20} = 410,1 \text{ mmgr. d'acide acétique.}$$

Et à :

$$\frac{410,1 \times 82}{60} = 560,4 \text{ mmgr. d'acétate de soude.}$$

Dans 1 litre du milieu nous avons donc au départ des expériences.

5604 mmgr. d'acétate de soude onhydre.

Soit :

$$\frac{5604 \times 24}{82} = 1640 \text{ mmgr. de Carbone.}$$

1^o série de culture : (50 cc. de milieu acétaté).

En opérant comme précédemment nous avons effectué des dosages journaliers sur des cultures de 24 heures, 48 heures, 3 jours, 5 jours, 6 jours 8 jours, 15 jours et 16 jours.

Nos cultures furent amenées à un volume de 110 cc. et nous avons distillé 100 du mélange.

Nous ne rapportons pas tous nos chiffres et calculs, nous donnons ici la série des résultats obtenus exprimés par rapport à un volume d'un litre du milieu primitif soit : 5.604 mmgr. $\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ ou 1.640 mmgr. de C.

Après 24 heures d'étuve :

Il reste dans la culture :

5240 mmgr. de $\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$.

d'où nous déduisons :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé.... = 364 mmgr.

soit :

C utilisé et transformé..... = 107 —

Après 48 heures d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 4.958 —

$\text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé..... = 646 —

soit :

C utilisé et transformé..... = 189 —

Après 3 jours d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 4.503 —

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé.. = 1.101 —

soit :

Cutilisé et transformé..... = 323 / —

Après 5 jours d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 3.806 —

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé... = 1.798 —

soit :

Cutilisé et transformé..... = 527 —

Après 6 jours d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 1.969 —

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé... = 3.635 —

soit :

C consommé..... = 1.064 —

Après 8 jours d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 1.130 mmgr.

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé... = 4.474 —

Soit :

Cutilisé et transformé..... = 1.310 —

Après 15 jours d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 825 —

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé... = 4.779 —

Soit :

Cutilisé et transformé..... = 1.399 —

Après 16 jours d'étuve :

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ restant..... = 796 —

$\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ utilisé et transformé... = 4.808 —

Soit :

Cutilisé et transformé..... = 1.407 —

Nous traduisons des résultats par la courbe I, qui exprime la consommation du carbone en fonction du temps.

Nous voyons qu'il s'agit d'une assimilation rapide et considérable de l'acétate, puisque le carbone transformé par les bactéries représente 85 p. 100 du carbone primitif. Une partie de ce carbone sert à la synthèse des corps microbiens eux-mêmes. Nous allons étudier ulté-

rieurement sous quelles formes nous pouvons retrouver le reste du carbone de la molécule acétique détruite.

Nous constatons aussi que cette transformation de la molécule acétique est surtout rapide entre le 5^e et le 8^e jour. Puis les phénomènes se ralentissent.

La 2^e série d'expériences effectuée parallèlement sur des cultures de 100 cc. nous donna les résultats suivants : le milieu primitif contenait nous le rappelons :

5.601 mmgr. de $\text{CH}_3 \text{CO}^2 \text{Na}$, par litre soit 1640 mmgr. de C.

	24 heures	5 jours	6 jours	8 jours	16 jours	26 jours	33 jours
	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.
Acétate restant.	5.271	4.407	3.995	2.413	1.576	1.201	1.011
— utilisé .	331	1.197	1.609	3.191	4.028	4.403	4.593
C. —	97	348	471	934	1.179	1.288	1.344

Le tracé N° II traduit ces résultats.

Ici encore nous assistons à une brutale consommation de la molécule acétique entre le 5^e et le 8^e jour, mais cette consommation se produit plus lentement que dans le cas précédent.

Au bout du 16^e jour : 72 % du carbone ont été transformés.

Au bout du 33^e jour seulement, cette proportion atteint 82 %.

Ces résultats viennent cependant confirmer les précédents :

La différence dans la rapidité de l'assimilation de l'acétate peut être due au fait que dans le 1^{er} cas la surface d'aération de la culture était plus grande que dans le 2^e.

La souche de Pneumobacille S₇ est donc capable d'utiliser l'acétate de Na, unique source de car-

bonne en un milieu synthétique et dans une proportion supérieure à 80 p. 100.

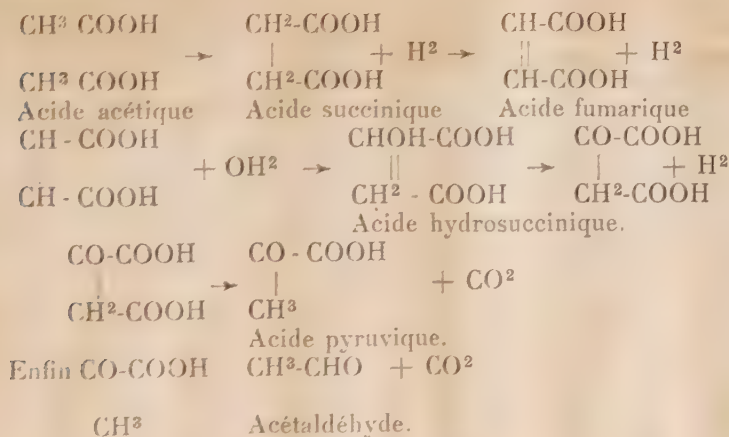
Aussi avons-nous été amenés à rechercher sous quelle forme pouvait se retrouver le carbone disparu en dehors de celui entrant dans la composition du corps microbien lui-même.

RECHERCHES QUALITATIVES : Dans leur ouvrage : *Physiology and Biochemistry of Bacteria* les auteurs BUCHANAN et FULMER (1930) rappellent les transformations possibles d'un acétate sous l'action des bactéries.

Celles-ci peuvent fournir aux dépens du carbone acétique.

1° de l'acide oxalique vu par BANNING en 1902.

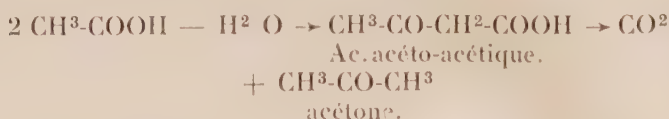
2° OPPENHEIMER en 1912 puis THENBERG en 1920 ont vu une libération de CO_2 avec formation intermédiaire d'acides succinique, fumarique, hydrosuccinique, pyruvique et enfin formation d'acétaldéhyde selon le processus suivant :



3° BERNHAUER et SCHEFFER (en 1932), signalent en parlant de l'acide acétique une véritable synthèse possible des acides malique et citrique.

ac. acétique $\rightarrow$ ac. succinique $\rightarrow$ ac. fumarique $\rightarrow$ ac. malique $\rightarrow$ ac. citrique.

4° KLUYVER et DONKER en 1926 donnent une transformation tout autre. Par le processus suivant ils expliquent la formation d'acétone.



5° Enfin BUCHANAN et FULMER relatent une décarboxylation brutale de l'acétate avec formation de CO^2 et méthane.



Nous inspirant de ces données nous avons nous-mêmes effectué successivement les recherches suivantes dans les liquides de cultures centrifugées au bout de vingt-quatre heures, trois jours, six jours, quinze jours.

1° Recherche des acides organiques : *Acides volatils.*

Nous avons construit les courbes des distillations successives effectuées précédemment, proportionnellement aux quantités totales d'acide distillé pour 100 centimètres cubes de culture, et nous les avons comparées à la courbe de distillation du milieu primitif.

Nous savons que la méthode de DUCLAUX permet de voir ainsi, si, dans le milieu étudié, il existe un mélange de plusieurs acides volatils. Toutes nos courbes ont eu la même allure et traduisirent la présence de l'acide acétique seul.

Une réaction de contrôle au nitrate d'argent ammoniacal nous a permis d'éliminer définitivement la présence d'acide formique.

Acides non volatils : Nous avons effectué aussi journellement dans les premiers jours d'étuve sur des liquides de cultures centrifugées ou filtrées les recherches des acides organiques signalés précédemment et en comparant à un témoin.

1° *Acide oxalique* : par le chlorure de Calcium en milieu acétique : Réaction négative.

2° *Acide succinique* : par le perchlorure de fer : Réaction négative.

3° *Acide pyruvique* : par la réaction de Simon : Réaction négative.

4° *Acide malique* : par le réactif de Denigès à l'acétate de mercure : Réaction négative.

5° *Acide citrique* : par le réactif de Denigès au sulfate de mercure : Réaction négative.

A aucun moment nous n'avons pu mettre ces corps en évidence.

2° **Recherche des corps réducteurs**: Nous avons étudié l'action des cultures sur la liqueur de FEHLING. Nous n'avons jamais obtenu de réduction.

3° **Recherche des corps volatils** : Elle fut effectuée sur le distillat des cultures.

Celles-ci furent en effet distillées et le 1^{er} tiers passant à la distillation fut recueilli et soumis aux essais suivants :

a) Recherche de l'*alcool* par le mélange sulfo-chromique : Résultats négatifs.

b) Recherche de l'*acétone* par l'iode en milieu alcalin : légère odeur d'iodoforme mais pas de précipité : vraisemblablement *traces d'acétone*.

c) Recherche des *aldéhydes* par le réactif de Schiff et le nitrate d'argent ammoniacal : Résultats négatifs.

d) Recherche de l'*acétyl-méthyl-carbinol* et du 2-3 *butylène glycol* par la précipitation à l'état de nickel diméthylglyoxime : Résultats négatifs.

Nous avons donc été conduits à envisager une décomposition brutale de l'acétate avec formation de **CO²** et **méthane**, et libération de la base qui contribuerait à l'alcalinisation du milieu.

Nous avons repris une étude quantitative pour rechercher le **CO²** combiné à l'état de carbonates et le **CO²** libre.

CO² Combiné : Nous avons recherché la présence de carbonates dans les liquides de culture. Nous avons mis ceux-ci très facilement en évidence et nous en avons effectué des dosages approximatifs au moyen d'un calcimètre composé comme suit : fig. I.

Un flacon A est destiné à contenir le liquide en expérience, on y introduit un petit tube contenant de l'acide chlorhydrique au demi. Le flacon A est bouché et communique avec un tube manométrique gradué B. Une ampoule C reliée à B par un tube de caoutchouc, permet d'égaliser la pression en B avec la pression atmosphérique.

En A, nous avons placé 10 cc. de culture sur lesquels nous avons fait réagir à 3 cc. d'HCl au 1/2. Le CO² libéré des carbonates se dégage en B et nous en avons mesuré le volume.

Dans le cas de la culture de 100 centimètres cubes, un dosage effectué

1° Sur 10 centimètres cubes au bout de 16 jours a donné : 6 cc. 5 de CO².

En raison de l'approximation du procédé si nous faisons la densité du CO²#2, ils correspondent à 13 milligrammes de CO². Soit pour un litre de culture 1.300 milligrammes de CO².

$$\text{Soit } \frac{1300 \times 12}{44} = 354, 5 \text{ mmgr. de Carbone}$$

soit 21 p. 100 du carbone primitif.

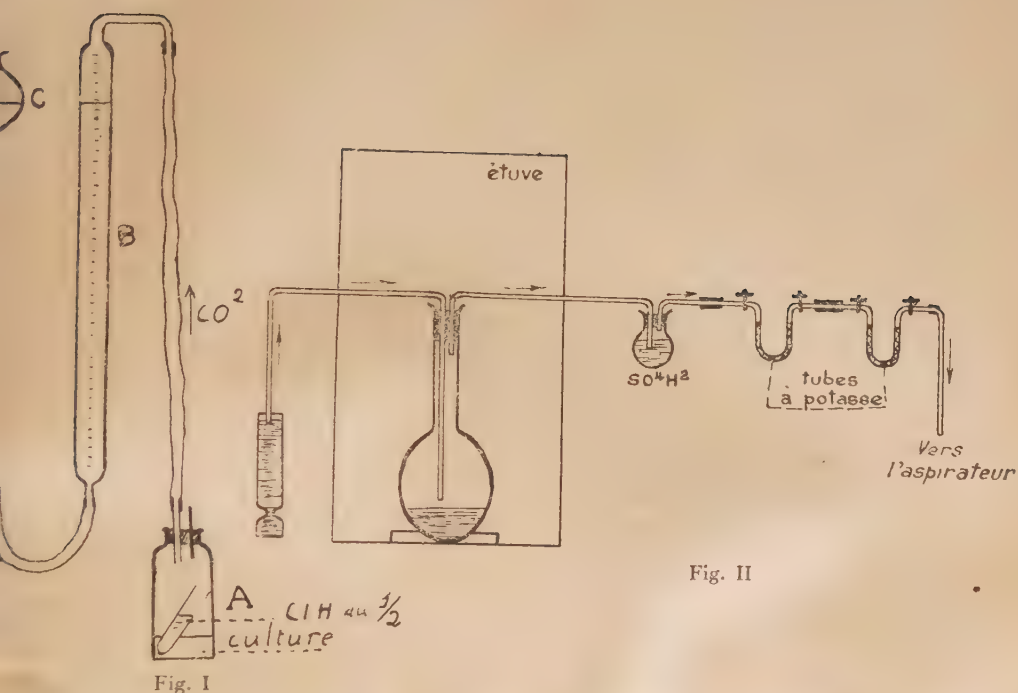
2° Pour une culture de 33 jours nous avons trouvé par ce même procédé : 7 cc.5 de CO².

soit 1.500 mmgr. pour 1 litre de culture

$$\text{ou } \frac{1500 \times 12}{44} = 409 \text{ mmgr. de Carbone}$$

soit 25 p. 100 du carbone primitif.

CO² Libre : Simultanément, nous avons suivi journellement l'étude du dégagement de CO² en utilisant le dispositif représenté par le schéma ci-contre :



Un ballon de 800 cc. est fermé par un bouchon à 2 trous et paraffiné. L'air extérieur après avoir été débarassé du CO^2 par passage sur une colonne à potasse arrive au niveau de la culture. Il est évacué par un tube traversant un laveur à $\text{SO}^4 \text{H}^2$ puis 2 tubes à potasse tarés.

Un aspirateur complète le dispositif.

L'augmentation journalière du poids des tubes nous donnait le poids de CO^2 libéré de l'acétate sous l'action bactérienne.

Nous avons encore opéré ici :

- 1° sur une culture de 50 cc.
- 2° sur une culture de 100 cc.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

(le poids total du CO^2 dégagé journallement correspond à la somme des augmentations de poids des 2 tubes à potasses consécutifs).

Pour le ballon contenant 50 cc. de culture nous avons obtenu les poids suivants de CO^2 dégagé.

Au bout de :

24 heures : 6 mmgr. : correspondant à 32,72 mmgr. de Carbone par litre

48	—	12	—	—	65,45	—	—
3	jours	26	—	—	141,80	—	—
4	—	50	—	—	272,72	—	—
5	—	68	—	—	370,90	—	—
7	—	86	—	—	469,08	—	—
8	—	106	—	—	579,08	—	—
10	—	118	—	—	640,62	—	—
14	—	126	—	—	687,10	—	—
16	—	128	—	—	698,18	—	—

Cette quantité de carbone représente 42 p. 100 du carbone initial.

2^o) Pour le ballon contenant 100 cc. de culture nous avons trouvé les quantités suivantes de CO^2 .

Au bout de :

24 heures : 10 mmgr. correspondent à 27,27 mmgr. de Carbone par litre

48	—	12	—	—	32,72	—	—
3	jours	30	—	—	81,81	—	—
4	—	56	—	—	152,7	—	—
5	—	97	—	—	264,54	—	—
7	—	139	—	—	379,09	—	—
8	—	159	—	—	433,63	—	—
10	—	170	—	—	463,63	—	—
14	—	210	—	—	572,72	—	—
16	—	229	—	—	624,50	—	—
26	—	259	—	—	706,36	—	—
33	—	264	—	—	720	—	—
49	—	267	—	—	728,17	—	—

Au bout de 16 jours le carbone du CO^2 dégagé représente 38 p. 100 du carbone initial. Au bout de 33 jours cette proportion est passée à 44 p. 100 et semble s'arrêter ensuite alors que dans le 1^{er} cas le dégagement de CO^2 s'était arrêté beaucoup plus vite.

D'après ces 2 études effectuées, l'une sur 50 cc. de culture, l'autre sur 100 cc. il nous apparaît que la con-

sommentation de l'acétate est plus brutale lorsqu'on opère avec une petite quantité de milieu, et une grande surface d'aération mais qu'elle atteint toujours cependant au bout d'un temps variable une proportion supérieur à **80 p. 100**. Le dégagement du CO^2 libre suit pour ainsi dire cette décomposition de la molécule acétique.

Nous traduisons, par les courbes ci-contre, les résultats obtenus précédemment. Ces courbes nous permettent de comparer, aux quantités totales de carbone acétique transformé, les quantités de carbone retrouvé sous-forme de CO^2 libre.

Les résultats sont exprimés en milligrammes de Carbone, en fonction du temps et pour 1 litre de milieu acétaté.

Courbe I : Utilisation du Carbone acétique par la bactérie S_7 dans une culture de 50 cc.

Courbe II : Utilisation du Carbone acétique par la bactérie S_7 dans une culture de 100 cc.

Courbe III : Dégagement du CO^2 par une culture de 50 cc. (exprimé en mmgr. de Carbone).

Courbe IV : Dégagement du CO^2 par une culture de 100 cc. (exprimé en mmgr. de Carbone).

Si nous additionnons le Carbone des carbonates et celui du CO^2 libre nous trouvons :

Pour une culture de *16 jours* : $624,50 + 354,5 = 979$ mmgr. de C.

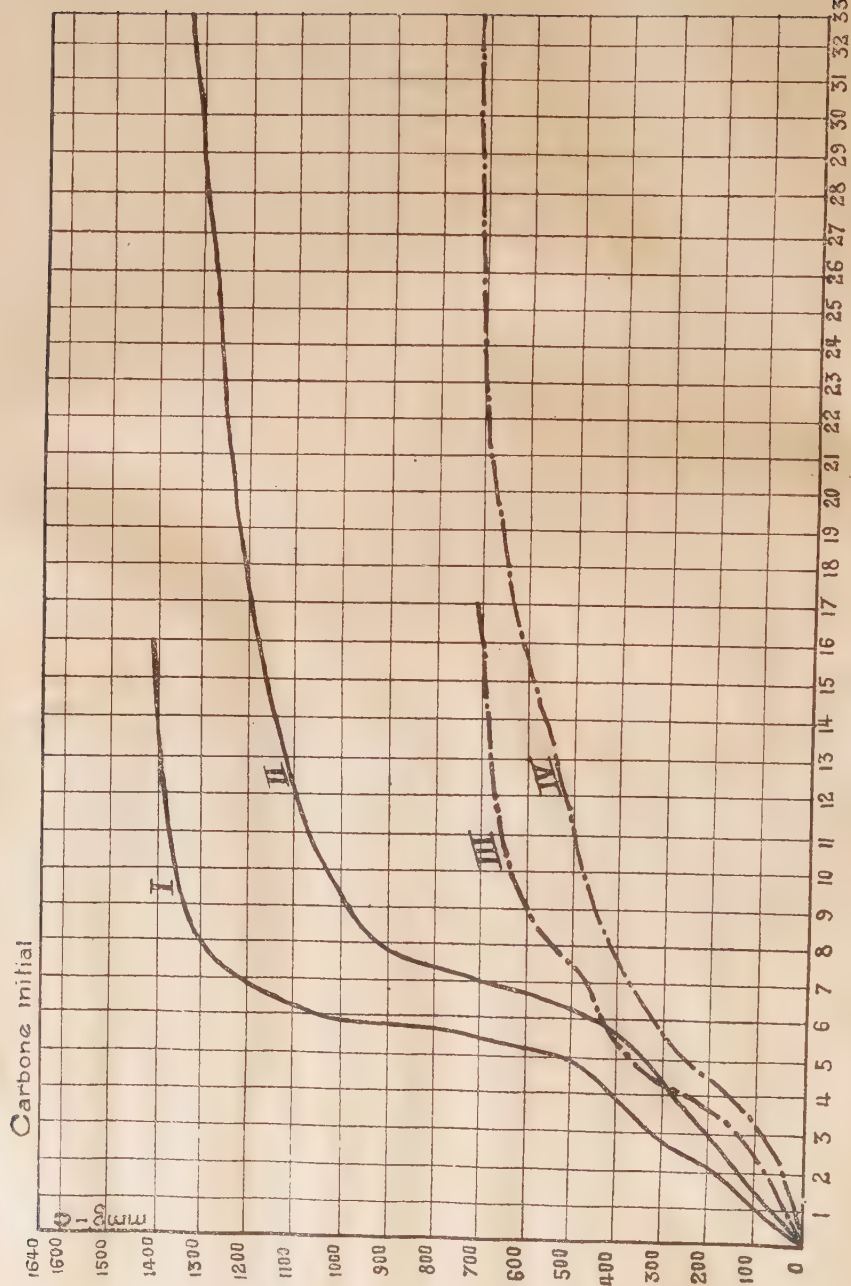
Soit : **59 p. 100** du carbone primitif.

Pour une culture de *33 jours* : $720 + 409 = 1129$ mmgr. de C.

Soit : **69 p. 100** du carbone primitif.

Or, précédemment nous avons trouvé pour ces mêmes cultures qu'au bout de seize jours, **72 p. 100** du carbone acétique avaient été transformés par le microbe S_7 , qu'au bout de trente-trois jours cette proportion était passée à **82 p. 100**.

Dans les 2 cas, nous avons donc **13 p. 100** du carbone non retrouvés.



Une partie de ce carbone entre dans le corps microbien lui-même ; nous avons pensé qu'une autre partie pouvait être combinée avec l'hydrogène de la molécule acétique et se retrouver à l'état gazeux sous forme d'un *carbure d'hydrogène*, principalement de **méthane**.

Pour cette recherche, nous avons cultivé notre souche microbienne S₇ sur milieu acétaté dans des *atmosphères limitées* de composition rigoureusement déterminées ; après un séjour de deux mois à l'étuve à 37° suivi d'un séjour de quatre mois à 20° (température du laboratoire) nous avons effectué l'*analyse des gaz composant les atmosphères finales contenues dans les ballons de culture*.

Voici dans quelles conditions nous avons opéré.

ANALYSE DES GAZ FORMÉS PENDANT LA CULTURE.

Préparation des cultures.

Nous avons utilisé des ballons à col étiré d'une contenance de 1 litre : soient A. B. C.

Nous avons introduit :

En A : 50 cc. de milieu acétaté.

En B : 100 cc. » »

En C : 100 cc.

Ces ballons furent stérilisés quinze minutes à 120° et ensemencés à partir de la souche S₇. Puis nous y avons introduit une quantité connue d'oxygène, dont ultérieurement nous avons déterminé la teneur en azote.

Préparation et introduction de l'oxygène en A, B, et C.

APPAREIL : Pour réaliser ces expériences nous avons utilisé :

Un générateur d'oxygène,

Une pompe à mercure,

Une trompe à mercure,

Des manomètres,

Un voluménomètre où nous avons opéré à volume constant.

TECHNIQUE. — 1° On fait le vide dans le voluméno-
mètre en le remplissant de mercure ;

2° Avec la pompe à mercure on fait le vide dans le
ballon générateur d'oxygène contenant de l'oxylithe, ainsi
que dans les canalisations ;

3° En laissant tomber quelques gouttes d'eau sur l'oxy-
lithe on obtient un léger dégagement d'oxygène destiné
à purger l'appareil des dernières traces d'air. On fait à
nouveau le vide et on le parfait à la
trompe à mercure ;

4° On met en communication le vo-
luménomètre et le générateur et on fait
dégager l'oxygène. On détermine le
volume ainsi introduit dans le volumé-
nomètre ;

5° On adapte le ballon de culture à
la place qu'occupait le générateur
d'oxygène. On y fait le vide ainsi que
dans les canalisations ;

6° On met en communication le vo-
luménomètre et le ballon.

La communication étant ensuite
rompue, on renvoie dans le voluméno-
mètre les gaz des canalisations et on
détermine l'oxygène restant. La diffé-
rence donne l'oxygène introduit dans
le ballon de culture ; celui-ci est ensuite

fermé par un joint au mercure réalisé comme l'indique
la figure ci-contre fig. III.

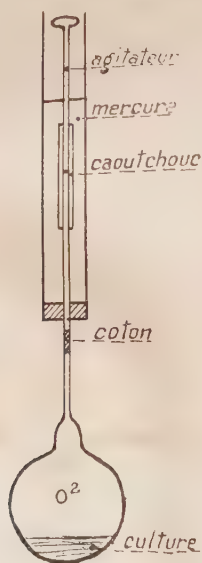


Fig. III

Détermination de la composition exacte de l'oxygène.

On fait des prélèvements de l'oxygène restant dans le
voluménomètre et on en détermine la teneur en azote
par absorption à l'hydrosulfite de sodium.

Analyse des gaz formés pendant la culture.

Au bout de six mois l'analyse est effectuée de la façon suivante :

I. — Mesure du volume gazeux des ballons.

II. — Sur des prélèvements de ce gaz on pratique ensuite :

1° L'absorption du CO_2 formé, par la potasse ;

2° La mesure du volume restant ;

3° L'absorption de l'oxygène par l'hydrosulfite de sodium ;

4° La mesure du volume gazeux restant qui est alors constitué par azote + ?

Nous allons rapporter pour le ballon B qui nous a donné le résidu gazeux le plus important, le détail des expériences précédentes et des calculs correspondants :

Pour les ballons A et C nous donnerons seulement les résultats obtenus.

BALLON B.

MESURE DU VOLUME D'OXYGÈNE INTRODUIT :

* Volume du volumétre à 0,760 : 1236 cc. 4

Hauteur du mercure au-dessus du 0 du tube manométrique communiquant avec le volumétre. Dans tout ce qui suit, cette hauteur sera désignée par Z.

$$Z = + 11, 5 \text{ à } 22^\circ.$$

$$H = 761, 4 \text{ à } 22^\circ 5.$$

soit : 758,7 à 0° (correction dilatation de la graduation).

Tension maximum de la vapeur d'eau : $F_{22} = 20,2$
d'où pression initiale réelle.

$$11, 5 + 558,7 - 20,2 = 769,2 - 20,2 = 749.$$

Après remplissage du ballon.

$$Z = - 231 \text{ à } 22^\circ.$$

$$H = 761,3 \text{ à } 22^\circ 5.$$

$$\text{Soit : } 758,6 \text{ à } 0^\circ.$$

Pression finale réelle.

$$- 231 + 758,6 - 20,2 = 527,6 - 20,2 = 507,4.$$

Différence entre les pressions initiale et finale

$$749 - 507,4 = 241,6$$

D'où volume d'oxygène introduit en B.

$$V_{0,760} = \frac{1236,4 \times 241,6 \times 273}{760 \times 295} = 363 \text{ cc. } 7$$

En opérant de la même façon nous avons trouvé :

Pour le ballon A : 290 cc. oxygène introduit

— — — C : 360 cc. — —

ANALYSE DE L'OXYGÈNE UTILISÉ :

Nous avons préparé l'oxygène à partir de l'oxylythe. Comme l'oxygène préparé de cette façon contient toujours un peu d'azote, nous avons déterminé le pourcentage de cette impureté sur des prélèvements successifs de l'oxygène contenu dans le voluméno-mètre.

Nous avons évalué les Z des différents prélèvements, et effectué leur somme.

Puis après avoir absorbé l'oxygène par l'hydrosulfite de sodium (additionné d'un peu de potasse) au moyen d'une pipette de DOYÈRE, nous avons déterminé le Z du résidu gazeux d'azote correspondant à ces 3 prélèvements.

Pour les ballons B et C nous avons utilisé le même oxygène. Voici la suite des résultats obtenus.

1^{er} prélèvement : Z = 160,5, à 21°,3

$$F_{21,3} = 18,8$$

$$H = 761,3 \text{ à } 22^{\circ}5$$

$$\text{ou } 758,7 \text{ à } 0^{\circ}.$$

D'où pression réelle

$$160,5 + 758,7 - 18,8 = 900,4$$

2^e prélèvement : Z = 107 à 21°4

$$F_{21,4} = 18,9$$

$$H = 761,3 \text{ } 22^{\circ} 5 \text{ ou } 958,7 \text{ à } 0^{\circ}.$$

pression réelle

$$107 = 758,7 - 18,9 = 846,8$$

3^e prélèvement : Z = 110 à 21°5

$$F_{21,5} = 10$$

$$H = 721,3 \text{ à } 22^{\circ} 5$$

Pression réelle

$$110 + 758,7 - 19 = 849,7$$

$$S_{1,2,3} = 900,4 + 846,8 + 849,7 = 2596,9$$

Après l'absorption de O², on a :

$$Z = -711 \text{ à } 22^{\circ},4$$

$$F_{22,4} = 20,1$$

$$H = 762,5 \text{ à } 23^{\circ} \text{ ou } 759,7 \text{ à } 0^{\circ}.$$

D'où :

Pression réelle du résidu gazeux

$$-711 + 759,7 - 20,1 = 28,6$$

Le pourcentage d'azote est ainsi :

$$\frac{28,6 \times 100}{2596,9} = 1,1 \text{ p. } 100 \text{ de l'oxygène introduit en B et en C}$$

Pour le ballon A les mêmes déterminations ont établi que l'oxygène utilisé contenait

$$1,35 \text{ p. } 100 \text{ d'azote.}$$

Nous avons donc pour les contenus gazeux initiaux des différents ballons.

$$\text{en A} = 286,1 \text{ cc de O}^2$$

$$3,9 \text{ cc de N}^2$$

$$\text{en B} = 359,7 \text{ cc de O}^2$$

$$4 \text{ cc de N}^2$$

$$\text{en C} = 356 \text{ cc de O}^2$$

$$4 \text{ cc de N}^2$$

ANALYSE DES GAZ FORMÉS PENDANT LA CULTURE

BALLON B :

Mesure du volume gazeux total au voluménomètre
volume du voluménomètre 1236 cc,4

$$Z = -566 \text{ à } 19^{\circ} 5$$

$$F_{19,5} = 17$$

$$H = 756 \text{ à } 20^{\circ} 5 \text{ soit } 753,6 \text{ à } 0^{\circ}$$

Pression réelle.

$$\begin{aligned} & (-566 - 17) + 753,6 = 169,6 \\ V_{0,760} &= \frac{1236,4 \times 273 \times 169,6}{760 \times 292,6} = 257 \text{ cc } 4 \end{aligned}$$

Puis 6 prélèvements furent effectués.

Pour tous la pression atmosphérique fut :

$$H = 755 \text{ à } 20^{\circ} 5$$

$$\text{soit : } 752,6 \text{ à } 0^{\circ}$$

$$\text{Or } F_{20,5} = 17,9$$

Nous avons trouvé successivement les Z suivants :

1 ^{er} prélèvement :		
+ 219 à T = 20°5	soit pression réelle	(219 — 17,9) + 752,6 = 953,7
2 ^e prélèvement :		
+ 244 à T = 20°5	—	(244 — 17,9) + 752,6 = 978,7
3 ^e prélèvement :		
+ 164 à T = 20°5	—	(164 — 17,9) + 752,6 = 847,6
4 ^e prélèvement :		
+ 112 à T = 20°5	—	(112 — 17,9) + 752,6 = 795,7
5 ^e prélèvement :		
+ 114 à T = 20°5	—	(114 — 17,9) + 752,6 = 797,7
6 ^e prélèvement :		
+ 204 à T = 20°5	—	(204 — 17,9) + 752,6 = 887,7

Sommes des 3 premiers prélèvements : 2780,1

— 3 derniers — : 2481,1

— 6 prélèvements : 5261,2

Après l'absorption de CO² par la potasse.

1^o Dans les 3 premiers prélèvements le Z est devenu.

$$+ 32 \text{ à } 20^{\circ} 5$$

$$H = 755 \text{ à } 20^{\circ}$$

$$\text{ou } 752,6 \text{ à } 0^{\circ}.$$

Nous rassemblons dans le tableau précédent les résultats de nos expériences.

Nous voyons que pour le ballon B seulement la différence entre le volume du résidu, et celui de l'azote initial est appréciable.

Nous avons été conduits à faire une **analyse eudiométrique** de ce résidu gazeux inconnu afin d'en étudier la composition.

ANALYSE EUDIOMÉTRIQUE

Nous avons vu précédemment que la pression réelle du résidu gazeux était $P_0 = 136,5$

Pendant toutes les opérations qui vont suivre la pression barométrique a été $754,5$ à 20°

soit $752,1$ à 0° .

Au résidu nous avons ajouté, de l'oxygène pur obtenu par électrolyse de l'eau en quantité telle que la pression est devenue :

$Z = 445$ à $21^\circ,1$

soit une pression réelle de

$$P_1 = (-445 - 18,6) + 752,1 = 288,5$$

Après passage de l'étincelle nous avons

$Z = -537$ à $21^\circ,1$

soit une pression réelle de

$$P_2 = (-537 - 18,6) + 752,1 = 196,5$$

Après absorption du CO_2 éventuellement produit nous avons :

$Z = -553$ à $21^\circ,1$

$$P_3 = \text{soit } (-553 - 18,6) + 752,1 = 149,5$$

Après absorption de l'oxygène non consommé :

$Z = -623$ à $21^\circ,1$

$$\text{soit } P_4 = (-623 - 18,6) + 752,1 = 90,5$$

Il y avait donc dans le résidu un gaz combustible. Pour déterminer sa nature nous nous sommes servi des **3 équations eudiométriques**, à savoir :

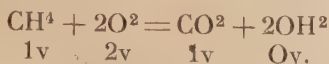
I. — Volume d'oxygène consommé

II. — — de gaz carbonique produit

III. — Contraction produite par l'étincelle.

Rapportés au volume de gaz brûlé, ces volumes permettent (dans les cas simples) de déterminer sa nature.

Pour le *méthane* nous avons en effet :



Nous raisonnons de la même façon sur les pressions.

Pression du gaz combustible.

$$P_0 - P_4 = 136,5 - 90,5 = 46$$

Pression de l'oxygène consommé : O² introduit — O² restant

$$\text{or O}^2 \text{ introduit} = 288,5 - 136,5 = 152.$$

$$\text{O}^2 \text{ restant} = 152 - 93 = 59.$$

$$\text{O}^2 \text{ consommé} = 152 - 59 = 93.$$

Contraction produite par l'étincelle.

$$P_1 - P_2 = 288,5 - 196,5 = 92.$$

$$\text{CO}^2 \text{ formé } P_2 - P_3 = 196,5 - 149,5 = 47,$$

Nous avons donc les résultats suivants que nous pouvons comparer avec les chiffres théoriques du méthane.

			cas du méthane
Gaz combustible.	. . . 46	soit 1 :	46
Oxygène consommé.	. . . 93	— 2 :	92
CO ² formé.	 47	— 1 :	46
Contraction	 92	— 2 :	92

L'accord est donc très bon. Dans le gaz analysé il y avait une petite quantité de méthane.

Le volume du résidu gazeux était 6,65 cc.

Nous y avons 4,4 cc. d'N²

D'où volume du méthane.

$$6,55 - 4,4 = 2,25 \text{ cc.}$$

Pour 1 litre de milieu acétaté ce chiffre nous représente un volume de 22 cc. 5 soit 12 mgr. de méthane.

représentant seulement 9 mmgr. 2 de C.

CONCLUSIONS : D'après les résultats précédents nous voyons que les ballons A et C n'ont donné entre l'azote

initial et le résidu final (azote plus gaz autre que CO^2 et O^2) que des différences de l'ordre des erreurs d'expérience soit 0 cc.6 dans un cas, et 0 cc.15 dans l'autre.

Le ballon B au contraire a donné une différence faible mais cependant un peu forte pour être une simple erreur. L'analyse eudiométrique a indiqué nettement la présence de **méthane**, mais en petite quantité. Cependant sa détermination ne fait aucun doute car la possibilité d'une rentrée d'air pendant les manipulations est éliminée par le fait que l'azote final est égal à l'azote initial et que méthane n'existe pas dans l'air.

Les produits résultant de la consommation de l'acétate utilisé par la bactérie dans une proportion supérieure à 80 % sont donc :

des carbonates
du CO^2 libre
et des traces de méthane
représentant de 60 à 70 p. 100 du carbone transformé.

En présence d'un accepteur d'hydrogène il semble que le processus de cette oxydation serait plus nettement mis en évidence, il serait peut-être possible de détecter des produits intermédiaires de décomposition de l'acétate.

4° *Les citrates source de Carbone.*

Nous avons suivi ici la même méthode que celle employée pour l'étude de l'assimilation de l'acétate de soude. Nous avons employé le sel de sodium de l'acide citrique comme source unique de carbone, réalisant ainsi l'épreuve de **Koser**, devenue classique et qui a une grosse valeur diagnostique dans le groupe *Coli-aerogenes*.

Le milieu utilisé fut celui employé par **KOSER** lui-même en 1924. Il contenait :

Cl Na.	5 gr.
SO ⁴ Mg.	0, 2
PO ⁴ HK ²	1
PO ⁴ H (NH ⁴) ²	1
Citrate de Na.	2, 77
Eau q. s. p.	1.000 cc.

Le milieu amené par addition d'une très petite quantité de soude au pH 7,5 était filtré, réparti comme précédemment par fraction de 20 cc. en petites fioles d'Erlenmeyer puis stérilisé 15 minutes à 120°.

D'après KOSER (1924-1926) les Pneumobacilles contrairement aux Colibacilles sont capables d'assimiler le carbone du citrate et de se développer dans un milieu où ce seul corps est l'aliment carboné.

Nous avonsensemencé systématiquement tous nos germes sur un tel milieu, puis les cultures furent placées à l'étuve à 37°. Les résultats furent vérifiés par passage de Koser en Koser.

En des temps variant de 24 à 48 heures tous nos échantillons microbiens nous donnèrent d'abondantes cultures sauf le 459 (bacille de l'Ozène) et le 1926 (bacille du Rhinosclérome) qui, par ce caractère semblent se différencier nettement des autres germes muqueux de cette famille.

L'utilisation du citrate s'effectue également avec une **alcalinisation** précoce du milieu.

Nous devons signaler que des essais de culture sur milieux de Koser, pratiqués avec des Colibacilles authentiques de la collection de M. LEGROUX à l'Institut Pasteur et des Coli-bacilles isolés au laboratoire ne nous ont jamais donné de cultures sur le milieu citraté.

Cette épreuve constitue donc un excellent test de différenciation entre Colibacilles et Pneumobacilles.

APPLICATION : **Gélose citratée.**

Nous avons pensé réaliser de cette épreuve une application pratique de laboratoire en utilisant le milieu de Koser sous forme de gélose citratée.

Au milieu synthétique précédent, à un pH convenable,

nous avons seulement ajouté de la gélose. Le milieu coulé ensuite en boîte de Pétri peut servir par *ensemencement direct* à l'isolement des *Pneumobacilles* à partir des selles, des urines, des eaux, du lait, etc...

Les *Pneumobacilles* et les germes voisins semblent très bien s'y développer en effet, à l'exclusion des *Coli-bacilles* et de nombreux bacilles plus exigeants : ce qui permet déjà une rapide différenciation.

D'autres sels d'acides organiques : *lactates*, *succinates* en particulier peuvent également être utilisés comme sources de Carbone et permettent des cultures très abondantes. Mais ils ne semblent présenter ni l'intérêt des acétates au point de vue du bilan carboné, ni le caractère différentiel des citrates puisque le *Coli-bacille* est également capable de les utiliser.

Les acides aminés, dont nous avons parlé en étudiant la nutrition azotée peuvent fournir à la fois aux bacilles du groupe *Lactis-aerogenes* l'azote et le carbone et permettent d'obtenir d'excellents milieux de cultures.

Urée source de Carbone : Par contre si l'urée constitue un excellent aliment azoté, elle est incapable à elle seule, de fournir au microbe le carbone qui lui est nécessaire.

Nous ne pouvons obtenir de culture sur urée qu'à partir d'un milieu contenant une autre source de carbone : un sucre, le glucose par exemple, ainsi que nous l'avons vu précédemment.

Les sucres, sources de Carbone.

Les fermentations sucrées dans le groupe *Lactis-aerogenes* ont fait l'objet d'un grand nombre de recherches.

La molécule sucrée est, en effet, très riche en carbone et offre celui-ci sous une forme facilement assimilable pour les microbes. Ceux-ci se comportent à son égard comme des agents oxydants et produisent de véritables fermentations. En général, elles se manifestent par une acidification violente et précoce des milieux.

Ce sont les modalités de cette acidification suivant les échantillons et les sucres étudiés, qui permettent les distinctions biochimiques entre les espèces microbiennes.

Nous avons étudié particulièrement l'assimilation du glucose, du lactose et du saccharose.

Utilisation du glucose. Étude de la production d'acétyl-méthyl-carbinol.

Toutes nos souches ainsi que les souches de Colibacilles typiques que nous avons pu leur comparer sont capables de se développer sur milieu glucosé peptoné, ou sur milieux synthétiques au glucose en produisant une acidification nette.

Le point important dans l'étude du développement sur de tels milieux est la production d'acétyl-méthyl-carbinol aux dépens du sucre. Elle est considérée comme un élément de diagnostic bactériologique précieux.

La fermentation butylène-glycolique qu'elle caractérise est en effet produite par le groupe *Aerogenes* et non par le groupe Coli et constitue un des caractères importants de la classification microbienne établie par BERGEY.

Aux dépens du sucre nous savons qu'il peut se former à côté de l'acétyl-méthyl-carbinol ($\text{CH}^3\text{-CH OH-CO-CH}^3$), du 2-3 butylène-glycol ($\text{CH}^3\text{-CHOH-CHOH-CH}^3$) et du diacétyle ($\text{CH}^3\text{-CO-CO-CH}^3$).

Ce fut GRIMBERT qui le premier en 1901, nota la production d'acétyl-méthyl-carbinol, qu'il identifia par son osazone, dans des cultures de *B. Tartricus* sur milieu sucré.

HARDEN et WALPOLE en 1906 étudièrent comparative-ment la fermentation du glucose par le Colibacille et le *B. Lactis aerogenes* en culture glucosée peptonée. Ils trouvèrent dans les cultures de ce dernier de l'acétyl-méthyl-carbinol et même du 2-3 butylène glycol.

HARDEN établit ensuite que cet acétyl-méthyl-carbinol provoquait la réaction décrite par VOGES et PROSKAUER en 1898.

HARDEN et NORIS en 1911 montrèrent que par addition d'un alcali l'acétyl-méthyl-carbinol est oxydé en diacétyle, lequel en présence du noyau guanidine des constituants du bouillon de culture donne à la réaction sa coloration caractéristique.

L'acétyl-méthyl-carbinol semblerait formé par condensation de 2 molécules d'acétaldéhyde sous l'action d'une diastase :



WALPOLE montra en 1911 que l'aération favorise la formation d'acétyl-méthyl-carbinol, et KLUYVER, DONKER et WISSER'T HOFF trouvèrent que sa production est augmentée par l'introduction d'accepteurs d'hydrogène dans le milieu.

De nombreux bacilles, en particulier le *Proteus* et le *Subtilis* donnent, aux dépens du glucose ou du saccharose qu'ils hydrolysent préalablement, d'importantes quantités d'acétyl-méthyl-carbinol.

Procédés de recherches. — L'oxydation en diacétyle ou la précipitation à l'état de nickel-diméthyl-glyoxime suivant la technique de M. LEMOIGNE (1920) constituent les bases des réactions utilisées pour le mettre en évidence dans les cultures microbiennes.

En 1931, DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et CHU rassemblent dans une publication les principales techniques usitées pour arriver à ce but. Ils utilisent une souche d'*Aerobacter aerogenes* cultivée sur le milieu suivant :

Peptone de Witte.....	5 gr.
Glucose.....	5
Phosphate bipotassique.....	5
Eau dist. q. s. p.....	1000 cc.
	à un pH : 7,5.

L'acétyl-méthyl-carbinol produit dans les cultures est au bout d'un temps variant de 24 heures à 3 jours et même 5 jours, par l'action de la soude ou de la potasse, oxydé en diacétylé, lequel en présence de la peptone

donne une coloration rose dont l'apparition est favorisée soit par addition d'eau oxygénée, soit par agitation.

Ces mêmes auteurs signalent un procédé de recherche utilisant le milieu de CLARKS et LUBS :

Phosphate disotique anhydre.....	7 gr.
— monopotassique.....	2
Acide aspartique	1
Glucose.....	4
Eau distillée.....	1000 cc.

A 5 cc. d'une culture de 14 à 24 heures sur un tel milieu on ajoute 1 cc. de solution fraîche de caséine à 0,2 p. 100 dans la soude diluée à 2 p 100, et 10 cc. de soude à 10 p. 100. Il apparaît alors une coloration rose commençant à la surface et atteignant son maximum en un temps variant de 1 heure à 24 heures.

La caséine fournit ici les peptones réagissant sur le diacétyle.

TECHNIQUE D'O' MEARA : A ces méthodes nous avons préféré celle indiquée par O' MEARA en 1931.

Celui-ci utilise pour ses cultures le milieu synthétique suivant que nous avons préparé et sur lequel nous avons éprouvé toutes nos souches.

Chlorure de Sodium.....	5 gr.
Phosphate bipotassique.....	1
— biammonique.....	1
Sulfate de Magnésium.....	0,2
Fumarate de soude 10 gr, ou acide fumarique	7 gr.
Glucose.....	5
Citrate de soude.....	2,77
Eau q. s. p.....	1000 cc.

Le pH est amené à 7,5 par addition de soude et après répartition par fractions de 20 cc. en fioles d'ERLENMEYER on stérilise à 110° pendant 20 minutes. On ense-
mence comme dans les épreuves précédentes à partir de cultures fraîches sur gélose.

Le milieu riche en éléments nutritifs permet une

croissance abondante des bactéries. Toutes nos souches s'y développent rapidement.

Employant ensuite la technique d'O'MEARA, au bout de **24 heures** nous avons ajouté dans chaque fiole environ 0 gr. 20 de *créatine* et 0 gr. 50 de *lessive de soude*. Après une agitation vive de 5 minutes nous avons obtenu lorsque les réactions étaient positives, une superbe coloration rose vif ne permettant aucune erreur d'interprétation.

La réaction peut également être effectuée au bout de **48 heures**. Le sucre est en effet utilisé d'abord par la bactérie avec « formation optimum » d'acétyl-méthyl-carbinol. Le citrate de soude semble tamponner l'acidification due à la fermentation du sucre.

Quant à l'acide fumarique, il joue vraisemblablement le rôle d'accepteur d'H favorisant ainsi la formation de l'acétyl-méthyl-carbinol.

Nous avons en effet réalisé le même milieu sans y mettre d'acide fumarique. Les réactions obtenues furent beaucoup moins nettes et la coloration rose pâle était fugace.

Sur nos 42 souches 5 nous donnèrent une réaction d'O'MEARA négative, même après un séjour plus prolongé à l'étuve : ce sont : *le 459* (bacille de l'ozène), *le 1926* (bacille du Rhinosclérome) qui s'écartent par là, d'avantage encore du *Pneumobacille*. Les autres germes sont : *Ladouffit*, qui, par ailleurs se montre un véritable *Pneumobacille*, le *Brunet* et le *N* tous deux isolés de mucosités nasales et par ce fait pouvant se rapprocher du bacille de l'Ozène.

Or, la classification américaine de BERGEY nous signale la production d'acétyl-méthyl-carbinol par les microbes du genre *Aerobacter* comme absolument différentielle d'avec le genre *Escherichia* (COLI), qui n'en fournit pas aux dépens des sucres.

MÉTHODE DE M. LEMOIGNE. — Nous avons pensé appliquer aux cultures pour lesquelles la réaction d'O'MEARA

s'était montrée négative une technique plus sensible permettant de déceler de plus petites quantités d'acétyl-méthyl-carbinol ; la différence entre nos souches, si nous obtenions un résultat positif, devenait ainsi seulement quantitative.

Nous avons utilisé pour cela la méthode mise au point par M. LEMOIGNE et MONGUILLON en 1930 ; ces auteurs précipitent l'acétyl-méthyl-carbinol oxydé préalablement en diacétyle par le perchlorure de fer, à l'état de nickel di-méthyl-glyoxime.

Nous avons utilisé le milieu suivant :

Bouillon de haricots à 70 gr. par litre :	1.000 gr.
Peptone Chapotaut	10 gr.
Glucose	20 gr.

Stérilisé à 110° pendant 20 minutes.

Chaque microbe étudié futensemencé sur 1 litre de milieu et la recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol effectuée ici au bout de 6 à 8 jours.

La totalité de la culture était additionnée de 50 cc. de perchlorure de Fer et d'un peu de paraffine pour éviter une mousse abondante. On distillait et recueillait 250 cc. du distillat. Celui-ci, à son tour était additionné d'une nouvelle quantité de perchlorure pour parfaire son oxydation, et rectifié.

Cette fois les 4 ou 5 premiers cc. passant à la distillation étaient recueillis dans 10 cc. du réactif suivant :

Solution de $\text{CH}^3 \text{CO}^2 \text{Na}$ à 40 %	2 parties
Sol. de chlorhydrate d'hydroxylamine à 40 %	1 —
» de chlorure de Ni à 20 %	1 —

Le diacétyle très volatil doit passer, s'il existe dans le milieu, dans les premières gouttes de distillat auquel il communique une légère teinte verdâtre.

Au contact du réactif primitivement vert, le diacétyle donne d'abord une coloration rose, puis on voit apparaître le précipité rouge de nickel-diméthyl-glyoxime, lequel est rassemblé en portant le tube à l'ébullition ; lavé

et séché il peut être pesé. Nous n'avons demandé à nos expériences qu'un résultat qualitatif.

Les 3 souches ainsi étudiées, *Ladouffit*, *Brunet* et *N* nous permirent de déceler dans leur culture, des quantités petites, mais dosables d'acétyl-méthyl-carbinol.

Nous voulions obtenir ces résultats ; malheureusement sur ce même milieu et suivant cette même technique nous avons ensemencé 5 Coli-bacilles typiques de la collection de M. LEGROUX, *Coli Selles*, *Coli Conserves*, *Coli H*, *Coli urine W*, *Coli F*.

Tous, sauf le *Coli Conserves* nous ont fourni des quantités du même ordre d'acétyl-méthyl-carbinol.

Dans tous les cas : pour nos germes muqueux et pour les Coli-bacilles précédemment cités, la *recherche du 2-3 butylène glycol fut négative*. Elle fut effectuée par oxydation à chaud par l'eau de Brome, des résidus des distillations précédentes pratiquées pour la recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol, puis nouvelle distillation du diacétyle susceptible de s'être formé sous cette action oxydante plus violente et précipitation à l'état de nickel-di-méthyl-glyoxime.

Conclusions : Il ressort de cette étude que des bactéries du genre **Coli** peuvent fournir de l'acétyl-méthyl-carbinol en petites quantités au même titre que certaines souches atypiques se rattachant nettement au genre **Aerobacter**. Pour que cette formation présente son caractère spécifique il faut chercher seulement à mettre en évidence une production relativement abondante d'acétyl-méthyl-carbinol.

La technique d'O'Meara nous semble rester un excellent test de diagnostic permettant d'établir une différenciation nette entre Pneumobacilles et Coli-bacilles. Il faut cependant distinguer un groupe bactérien de germes muqueux que nous pouvons dire intermédiaires entre ces 2 espèces typiques mais se rattachant davantage au Pneumobacille par leurs autres caractères et ne permettant pas, par les techniques qualitatives rapides habi-

tuelles, de déceler la présence d'acétyl-méthyl-carbinol dans leurs cultures sur milieux glucosés.

II. — Utilisation du lactose.

On considère habituellement le Pneumobacille comme un germe acidifiant les milieux lactosés, se rapprochant par là du Coli-bacille et se différenciant des Typhiques et Paratyphiques et du Proteus.

Action sur la Gélose lactosée tournesolée: L'épreuve classique est l'ensemencement sur gélose lactosée tournesolée.

Or, appliquée à nos souches cette expérience nous a montré dans 29 cas sur 42 l'absence totale de virage au rouge; 3 seulement acidifièrent nettement le milieu, les 10 autres germes provoquèrent d'abord le virage au rouge puis rapidement en retour à la teinte neutre (*caméléonage*).

Nous avons cherché à élucider quelque peu cette question et nous nous sommes demandés si les bacilles étudiés étaient capables d'utiliser le lactose comme source unique de carbone.

Lactose source unique de Carbone: Nous avons préparé un milieu synthétique au lactose de la composition suivante :

Cl Na.	5 gr.
SO ⁴ Mg.	0,2
PO ⁴ H K ²	1
PO ⁴ H (NH ⁴) ²	1
Lactose	1
Eau	1.000 cc.

à un pH = 7,5. Stérilisation à 110° pendant 20 minutes.

Nous avons opéré comme dans les recherches précédentes (épreuve de Koser, O'Meara, etc...).

Presque tous nos échantillons microbiens ont donné lieu à un développement plus ou moins rapide mais en général abondant.

Seuls les germes 672, *Eude. Brunet*, et les 2 souches 459 (ozène) et 1926 (Rhinosclérome) ne nous permirent aucune culture.

Des prélèvements journaliers effectués dans les cultures afin de mesurer les pH, nous ont montré presque toujours une acidification rapide et violente. Seul le germe *Chal* nous a donné au bout de quelques jours une culture sans modifier le pH du milieu.

Dans presque tous les cas d'acidification nous avons vu les pH passer par un minimum puis à nouveau remonter pour parfois revenir au bout d'un temps plus ou moins long au pH initial. Nous pouvons rapprocher ce phénomène de celui du *caméléonage*.

Nous n'avons pas étudié le métabolisme de cette utilisation.

Nous concluons seulement que, dans une proportion voisine de 90 %, les germes du groupe Lactis-aérogènes sont capables d'assimiler le lactose comme source unique de carbone.

D'autres épreuves peuvent être rapprochées des précédentes en particulier l'étude du développement en :

1° **Lait tournesolé** : Certains échantillons ont fourni une acidification rapide du milieu se traduisant par un rougissement du tournesol. La coagulation se produit au bout d'un temps plus ou moins long, variant de vingt-quatre heures à plusieurs semaines.

Cependant 9 de nos souches même après un séjour de un mois et plus à l'étuve furent incapables de coaguler le lait qui resta dans son état primitif ou présenta parfois un léger bleuissement.

Le 459 (bacille de l'Ozène) se distingua encore ici en provoquant un bleuissement intense du tournesol traduisant une alcalinisation du milieu.

2° **Petit lait tournesolé** : La même instabilité se rencontre en cette nouvelle épreuve.

De nombreuses souches provoquèrent l'acidification ra-

pide du milieu (virage au rouge suivi presque toujours d'une décoloration totale).

D'autres laissèrent le milieu à sa teinte neutre. D'autres enfin (le 459 surtout) provoquèrent l'alcalinisation du petit lait tournesolé.

Nous rassemblons dans le tableau n° III p. 74 les résultats de ces épreuves. Nous sommes frappés par la discordance des résultats obtenus dans les épreuves en milieu lactosé, et il nous est impossible de leur accorder une valeur diagnostique importante.

Dans le groupe Coli cependant les résultats semblent plus constants : rougissement de la gélose lactosée tournesolée et coagulation du lait.

III. — Utilisation du Saccharose :

Le saccharose paraît particulièrement intéressant dans l'étude de la nutrition carbonée de nos bacilles muqueux, d'une part en raison de son aptitude à produire la substance gommeuse (FERNBACH et SCHOEN 1925), et d'autre part comme épreuve différentielle d'une certaine valeur dont les résultats peuvent être rapprochés d'expériences utilisant l'*inosite* comme source de carbone.

A cet effet nous avons préparé un milieu contenant 5 grammes de saccharose dans une eau peptonée à 2 p. 100 à un pH 7,5.

Nous avons noté dans quelles proportions nos souches étaient capables de se développer sur ce milieu au saccharose et d'en provoquer la fermentation. Les pH furent notés après 3 et 5 jours d'étuve.

Les essais ont été effectués avec 30 germes : 24 se sont montrés capables de fermenter le saccharose.

L'inosite source de carbone :

Dans le groupe Lactis-aerogènes cette fermentation du saccharose a été rapprochée par certains auteurs de l'utilisation et de la fermentation de l'inosite, bien que ce dernier corps se présente comme un alcool.

Voici quelques données à ce sujet :

HEES et TROPP en 1926 décrivaient ces 2 épreuves comme permettant une discrimination rapide entre *Coli* et *Friedlander*.

D'après leurs expériences *I Coli* sur 23 fermentait l'inosite. Tous les *Friedlander* au contraire le fermentaient.

HUEPPE dès 1885, PRANGE en 1935 en pratiquant ces mêmes essais trouvèrent des souches intermédiaires entre les *Lactis-aerogènes* et les *Coli-bacilles* et en firent un groupe *Acidi-lactici*.

POUR PRANGE :

Sur 24 <i>Coli</i>	{ 24 ne fermentent pas l'inosite 12 fermentent le saccharose 12 ne le fermentent pas.
Sur 7 <i>lactis aerogenes</i>	{ 7 fermentent l'inosite 7 — le saccharose.
Enfin sur 7 bacilles <i>Acidi lactici</i>	{ 7 ne fermentent par l'inosite 7 ne fermentent pas le saccharose.

En 1922 KUMAGAWA avait étudié aussi l'utilisation de l'inosite par le bacille *Lactis aerogenes*. Son milieu contient :

Inosite.....	2 gr.
Peptone.....	1 gr.
Cl Na.....	0,5
CO ³ Ca.....	1
Sulfite de Ca fraîchement préparé	4
Eau.....	1000 cc.

Il observait au bout de 4 jours sous l'action du *Lactis aerogenes* la production d'acétaldéhyde et même d'acide lactique. Au bout de 12 jours l'inosite avait complètement disparu du milieu.

Nous avons réalisé les expériences de fermentation de l'inosite sur un milieu contenant : 5 p. 1000 d'inosite dans une eau peptonée à 2 p. 1000 ; stérilisé à 110° pendant 20 minutes pH : 7,5.

30 souches furent ensemencées : 20 fermentèrent l'inosite, 10 ne le fermentèrent pas.

Si nous rassemblons les données des 2 épreuves de fermentation du saccharose et de l'inosite nous avons :

sur 30 germes muqueux du groupe lactis-aerogenes	{	19 souches fermentant le saccharose et l'inosite.
		5 souches fermentant le saccharose ne fermentant pas l'inosite.
		5 souches ne fermentant pas le sac- charose fermentant l'inosite.
		1 souche ne fermentant pas le sac- charose fermentant l'inosite.

Nous avons donc 5 de nos germes qui peuvent se ranger au nombre des *Acidi lactici* de HUEPPE et PRANGE.

Mais nous voyons d'après les tableaux ci-contre que ces bactéries ne peuvent pas ailleurs constituer un groupe uniforme.

Par contre parmi les 5 germes fermentant le saccharose et ne fermentant pas l'inosite nous retrouvons : le *Remy*, PL, le 516, et 1684 que nous avons décrits précédemment comme mobiles en cultures très jeunes, puis, que nous verrons devenus légèrement protéolytiques à l'égard de la gélatine. Nous rassemblons ultérieurement tous les caractères de ces bactéries atypiques (Tableau IV).

L'alcool éthylique source de carbone :

Quelques-unes de nos expériences ont porté sur l'utilisation de l'alcool éthylique qui s'est montré capable de fournir le carbone à un certain nombre d'échantillons. Nous avons vu précédemment que des bactéries capables de se développer sur un milieu acétaté sont celles qui peuvent parfois également utiliser l'alcool.

Dans notre étude ce fait nous a semblé confirmé pour un certain nombre de nos germes. La consommation de l'alcool éthylique, seule source de Carbone dans un milieu synthétique, s'effectue avec une acidification nette du milieu due vraisemblablement à la formation d'acide acétique sous l'action oxydante des bactéries.

Ce point nous paraît intéressant à signaler étant donné qu'à part les bactéries acétiques peu de germes ont été

cultivés dans de tels milieux, en particulier en ce qui concerne les bactéries pathogènes.

Nous nous proposons de poursuivre ces recherches.

Action des bactéries sur l'esculine :

L'esculine, glucoside extrait du marron d'Inde, sous l'action de certains ferments (émulsine) se dédouble en *glucose* et *esculétine*, diphénol complexe qui, en présence de citrate ferrique produit une coloration brune ou noirâtre suivant la réaction du milieu.

Ce furent HARRISON et VAN DER LECK qui en 1908 pour la 1^{re} fois étudièrent, pour la recherche du Coli bacille dans les eaux, son action sur ce glucoside en bouillon esculiné additionné de sels biliaires.

De même LOHNIS en 1912, utilise un milieu esculiné citraté pour déceler le Coli bacille dans le lait. Ces auteurs signalent un noircissement du milieu sous l'action du Coli-bacille.

ROCHAIX en 1923, puis ROCHAIX et SARDA en 1926 étudièrent l'action des germes intestinaux sur une gélose esculinée préparée comme suit :

On fait bouillir jusqu'à dissolution dans 1000 cc d'eau

Peptone de Witte	10 gr.
Sels biliaires	2 gr, 5
Gélose	15 gr.

On neutralise, refroidit au dessous de 60°, ajoute 2 blancs d'œuf, porte à l'ébullition dès que l'albumine est coagulée. On neutralise et filtre, puis ajoute.

Esculine	1 gr.
Citrate de fer	1 gr.

Ce milieu réparti dans des tubes à essais est stérilisé, puis on y pratique les ensemencements en piqure le long de la paroi du verre.

Une *réaction positive* se traduit par un *noircissement* des stries. Les résultats sont notés au bout de 8 heures et 24 heures d'étuve.

Pour les auteurs précédemment cités, 7 *Pneumobacilles* sur 9 provoquent le noircissement du milieu. Les *Coli-bacilles* au contraire, en général donnent un résultat négatif.

Cette étude fut reprise en 1935, par JAMES, CROSNIER et MOREL, sur un milieu sans sels biliaires. Pour eux le *Colibacille* aurait une action incertaine sur la gélose à l'esculine. Comparable à celle de l'*Entérocoque* au contraire, par sa constance, serait l'action du *Pneumobacille* sur ce même milieu.

Avec 12 *Pneumobacilles* ces auteurs ont en effet obtenu 12 résultats positifs.

Nous avons cherché à contrôler ces résultats.

Trente-huit de nos germes ont été éprouvés; 23 nous ont donné un noircissement de l'esculine en 8 heures, 26 en 24 heures.

Nous devons noter que, parmi les 12 souches microbiennes donnant un résultat négatif nous retrouvons d'abord les 5 bacilles muqueux atypiques mobiles en cultures jeunes signalés précédemment, puis le bacille de l'Ozène et le germe voisin Brunet isolé d'un mucus nasal; enfin le germe Ladouffit qui se présente aussi comme un *Pneumobacille* atypique puisqu'il ne donne pas la réaction d'O' MEARA.

Si nous faisons abstraction de ces bacilles intermédiaires nous trouvons que, sur 30 bacilles de Friedlander typiques 26 provoquent le dédoublement de l'esculine soit une proportion de 87 p. 100.

Cette épreuve sans présenter une spécificité absolue nous semble un bon élément de diagnostic. Tous les contrôles effectués au laboratoire avec des *Coli-bacilles* ont donné des résultats négatifs.

Nous transcrivons dans le tableau III les résultats de nos expériences. Nous sommes frappés par la *coïncidence absolue* entre les 2 épreuves : fermentation de l'inosite et dédoublement de l'esculine; ceci nous amène à penser que ces 2 modifications pourraient être dues à un même ferment ou à des ferments très voisins.

NUTRITION CARBONÉE

TABLEAU III

Noms	Epreuve de Koser	Epreuve d' O'Meara	Assimi- lation de l'acétate de sodium	Fermen- tation du Saccharose	Fermen- tation de l'Inosite	Noircis- sment de l'Esculine	Gélose lactosée tournesolée	Lait tournesolé	Petit lait tournesolé	Assimilation du Lactose en milieu synthétique	
										Culture	pH
1 2 Remy Eude Beauv. Janv. Suberville	++++++	++++++	3 j. — — — + — — 10 j. — — — — — —	++++ +	++ — +	8 h. — — — — — 24 h. ++ — — — —	— + — — — + — — — —	+++++	+++++	++++	3 j. 15 j. 5 6 5 6,5 5 6
											4,5 4,5 5 4,5 5 5
											5 5 5 6,5 7,5 7,5 4,5 5
											4,5 4,5 5 4,5 5 5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
SP Denf. Chal PL 672	++++	+++++	— — — — — — — — — —	+++++	— — — — —	— — — — —	— — — — —	++ — ++	+ — — +	++	5 5 5 6,5 7,5 7,5 4,5 5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
2.794 2.651 243 418 4.140 2.926 3.279 99	+++++	+++++	— — — — — — — — — —	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	— — — — —	+ — + + +	+ — + + +	++	4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5
											4,5 4,5 5 5,5 5 5,5 4 4,5 5 5,5 4 4,5

CONCLUSIONS. — De cet ensemble de caractères morphologiques et biochimiques naît une grande confusion. Une classification absolue est difficile à établir entre tant de germes voisins.

Ils forment une série de *microbes intermédiaires* entre 2 espèces typiques, nettement caractérisées : Les Pneumobacilles et les Colibacilles.

Nous sommes amenés à prendre comme tests biochimiques de différenciation entre ces 2 espèces, les épreuves d'O'MEARA, de KOSER et la formation d'indol.

1° Nous appellerons **Pneumobacille typique** tout microbe muqueux, immobile en culture de vingt-quatre heures, capsulé donnant le *clou* en gélatine, l'épreuve d'O'MEARA positive, l'épreuve de KOSER positive, la recherche de l'indol négative, dédoublant l'esculine, fermentant l'inosite et le saccharose ;

2° Nous ferons un groupe microbien très voisin du premier, des germes muqueux donnant une réaction d'O'MEARA négative parmi lesquels nous trouvons les bacilles de l'Ozène et du Rhinosclérome ;

3° Nous rassemblerons encore dans une autre famille microbienne voisine les bacilles du type P. L., mobiles en cultures de vingt-quatre heures et susceptibles de devenir faiblement protéolytiques.

Ces 3 formes microbiennes de « *Bacillus Mucosus Capsulatus* » se différencient nettement du **Coli-bacille typique** auquel nous attribuons les caractères suivants : bacille non muqueux, mobile même en culture de vingt-quatre heures non capsulé, ne donnant pas le clou en gélatine, donnant une réaction d'O'MEARA négative, ne se développant pas sur milieu de Koser, produisant de l'indol, ne dédoublant pas l'esculine, ne fermentant pas l'inosite et ayant une action inconstante sur le saccharose (tableau IV, p. 88).

CHAPITRE IV

QUELQUES PHÉNOMÈNES DE MUTATIONS BACTERIENNES

Un important travail du Dr MARCHAL élève du professeur LASSEUR à Nancy expose en 1932, sous le titre *Variation et mutation en bactériologie*, des données très intéressantes sur des problèmes qui se posent de plus en plus impérieusement dans le monde microbien. Nous y trouvons une importante bibliographie de cette vaste question.

La nature des milieux, leur pH, le vieillissement des germes, l'addition aux cultures de substances antiseptiques ou non, peuvent agir sur l'aspect des colonies microbiennes, la forme des microbes, faire varier leur pigmentation, leurs propriétés biochimiques et immunologiques.

Chez un même microbe nous connaissons en effet des formes sporulées, d'autres non ; on a signalé des formes filtrantes infra-visibles, de germes généralement révélés par le microscope.

Dès 1891, GESSARD parmi les premiers observa des variations dans la pigmentation des bacilles pyocyaniques.

WOLF en 1909 créa des races achromogènes de bacilles *Prodigiosus*.

AUBEL et COLIN en 1913 étudièrent l'action des sucres sur la formation de la pyocyanine.

Depuis lors, à l'école de M. LASSEUR à Nancy, de nombreuses publications ont été faites à ce sujet. Celui-ci a établi une formule de milieu synthétique donnant des variations qualitatives et quantitatives très étendues de

la sécrétion pigmentaire et même la formation de matières colorantes par des bactéries naturellement achromogènes.

Ces caractères nouveaux disparaissent souvent si on supprime la cause qui leur a donné naissance, mais ils peuvent persister et donner au microbe une allure toute nouvelle, constituant alors de véritables « modifications durables » pour certains auteurs qui ne veulent pas employer le terme de « mutations » en bactériologie.

Ces mutations peuvent être *provoquées expérimentalement* ou *se produire spontanément* dans les cultures.

Dans le groupe bactérien que nous étudions des variations provoquées très intéressantes ont été signalées par A. GORY dans la thèse qu'il effectua en 1925 au laboratoire de M. LEGROUX à l'Institut Pasteur. Il obtint des modifications importantes macroscopiques et microscopiques chez les bacilles du côlon (Dysentériques, Typhiques, Vibrion cholérique) par addition de filtrats d'eaux d'égouts à des cultures liquides. Par ce même procédé le Colibacille serait muté en *Bacillus capsulatus* dont GRIMBERT signale la fréquence dans les eaux souillées.

Ce fait constituerait une mutation durable car jusqu'alors, on a bien réussi à décapsuler des bacilles muqueux, mais on n'a pu encore *in vitro* leur faire acquérir les caractères essentiels des Colibacilles.

Des cas de mutations spontanées sont observés journellement dans les cultures où apparaissent les formes *Smooth* et *Rough* traduisant des aspects morphologiques et biochimiques très différents d'une même bactérie.

Ces dernières mutations peuvent être réservibles, non durables; elles ont été observées chez un grand nombre d'espèces microbiennes. Vues dès 1921 par ARKWRIGHT qui proposa les appellations précédentes, elles ont été étudiées par un nombre croissant de chercheurs : COWAN, ANDREWES, etc...

JULIANELLE en 1928 fit un exposé intéressant des variations *Smooth* et *Rough* dans les cultures de Pneumo-

bacille de FRIEDLANDER ; nous en avons rapporté les données essentielles au chapitre I, elles nous font connaître des aspects très différents des bactéries que nous étudions.

Tout récemment en octobre 1935, MM. COTONI et POCHON ont signalé et étudié des variations analogues chez des Pneumocoques conservés en dehors de l'organisme.

Nous-même avons observé fréquemment pour un même bacille ces aspects microbiens variés sur des milieux solides et noté ces variations ; mais notre attention a été principalement attirée par des phénomènes de véritables mutations bactériennes, mutations durables et que nous rapportons ici.

Première mutation observée : Chromogénèse apparue dans une souche de pneumobacille observée depuis dix-huit mois.

L'apparition de propriétés chromogènes chez un germe habituellement achromique constitue un des exemples les plus caractéristiques des phénomènes de mutation.

En ce qui concerne le bacille de Friedlander, l'apparition d'un pigment dans une souche précédemment incolore ne semble guère, jusqu'à présent, avoir été signalée.

KRAUSS en 1926 décrit cependant une bacille muqueux, protéolytique et chromogène qu'il appelle *Bacillus mucosus mutabile*.

Dans la même famille bactérienne les variétés jaunes de bacille d'EBERTH surtout ont donné lieu à des recherches intéressantes. Signalées dès 1906, elles ont été considérées en 1918 par EISENBERG comme variantes du Colibacille. Pathogènes, elles diffèrent surtout des souches typhiques vraies par leurs propriétés antigéniques. (VON GARA 1933, SEYDEL 1934.)

Des espèces chromogènes du bacille du colon ont été de même étudiées par NATHALIE MAZEPORA en 1931. En 1935 M^{me} AITOFF, M^{lle} DOBKEWITCH et M^{lle} DION au

laboratoire du Dr DEBAT à Garches isolent un bacille jaune voisin du *Pneumobacille*.

Nous rapportons ici le fait que nous avons observé nous-mêmes et qui nous paraît intéressant car il nous a permis d'étudier un bacille chromogène après en avoir défini les caractères alors qu'il était incolore. Nous regrettons vivement de n'avoir pu poursuivre cette étude, l'apparition de la chromogénèse semble en effet coïncider avec celle d'une fragilité extraordinaire, et il nous a été impossible de conserver notre souche vivante, pendant plus de trois mois.

Caractères du germe primitif achromique. Un germe rencontré en culture pure en octobre 1932 dans l'expectoration d'un malade atteint de broncho-pneumonie est identifié comme un *Pneumobacille* typique. Il présente, en effet, les diverses propriétés qui caractérisent cette variété microbienne ; bacille immobile, gram négatif, capsulé, donnant sur gelose des colonies très muqueuses, en bouillon une culture abondante avec collerette épaisse à la surface, en gélatine un « clou » très net. La gélatine n'est pas liquéfiée, pas de production d'indol en eau peptonée. L'épreuve de VOGES-PROSKANER (production d'acétyl-méthyl-carbinol par oxydation du glucose) est positive, de même que l'épreuve de KOSER (utilisation du citrate de soude comme source unique de carbone en milieu synthétique). Seul, parmi les caractères classiques du bacille de Friedlander faisait défaut le virage au rouge de la gélose lactose tournesolée, mais l'on sait actuellement combien le résultat de cette épreuve est inconstant.

La virulence expérimentale du microbe était très marquée, en particulier pour le cobaye (dose mortelle 10^{-4}) et pour la souris (dose mortelle 10^{-5}) par voie sous-cutanée, et nous avons pu mettre en évidence dans les cultures filtrées une toxine soluble à action nette, particulièrement active chez le lapin.

Apparition de la chromogénèse. Cette souche était conservée au laboratoire, entretenue par passages suc-

cessifs comme les autres échantillons de la collection. Or, un jour (avril 1934) un tube de gélose glucoséeensemencé à partir d'une culture en milieu synthétique au glucose restée à l'étuve pendant quarante jours, présentades colonies muqueuses offrant l'aspect habituel d'une culture de Pneumobacille mais avec une **teinte jaune d'or** extrêmement marquée.

On crut d'abord à une souillure, mais les examens microscopiques répétés et les repiquages établirent la pureté de la culture constituée par un bacille immobile, encapsulé, gram-négatif.

Caractères du germe chromogène. Cependant, si la plupart des caractères du Pneumobacille se retrouvaient nettement, certains d'entre eux étaient très atténués ou absents; c'est ainsi que la production d'acétyl-méthylcarbinol était réduite à l'état de traces et le développement sur milieu de Koser très peu abondant. La virulence expérimentale du germe avait de même, baissé très notablement: des cobayes injectés sous la peau avec 2 cc. d'une culture de vingt-quatre heures survécurent sans avoir présenté de troubles notables; même absence du pouvoir pathogène pour la souris qui supportait l'injection sous-cutanée de 0 cc. 5 de culture.

Éprouvé au point de vue sérologique avec un sérum de lapin préparé vis-à-vis du Pneumobacille type I (groupe auquel appartenait cet échantillon microbien) notre germe chromogène donnait une réaction de précipitation très nette, tous contrôles (sérum de lapin normal, filtrats d'autres variétés microbiennes) fournissant un résultat négatif. L'épreuve de l'agglutination ne put être pratiquée dans des conditions valables, le germe se montrant hyper-agglutinable même avec le sérum de lapin normal.

La *production de pigment* se manifestait plus ou moins rapidement suivant les *conditions de culture*, apparaissant plus tôt à l'obscurité qu'à la lumière et à l'étuve qu'à la température du laboratoire, et sous des aspects variés

suivant le milieu utilisé : la piqûre en gélatine donnait un clou doré, l'ensemencement sur pomme de terre une teinte orangée, le développement en milieu liquide incolore un dépôt jaune d'or de corps microbiens sans diffusion du pigment. En même temps que l'atténuation ou la disparition de la virulence et de certains caractères biochimiques, nous avons noté la fragilité de ce germe « muté », qui sans doute par suite d'un phénomène d'autolyse n'a pu être conservé vivant par repiquages ni par incorporation à la gélatine.

De cette mutation *in vitro* on peut, croyons-nous, rapprocher le fait que des échantillons de l'expectoration du malade, prélevés récemment, nous ont donné en culture pure un germe muqueux se présentant comme un *Pneumobacille* atypique, bacille gram-négatif immobile et capsulé donnant un clou dans la gélatine mais se développant très mal en milieu de KOSER, ne produisant pas d'acétyl-méthyl-carbinol, par la réaction d'O'MÉARA et sans pouvoir pathogène expérimental appréciable. Il nous a été impossible jusqu'à présent d'en obtenir une culture chromogène.

Deuxième mutation observée : Nouveau cas de chromogénèse.

Depuis lors, nous avons eu l'occasion d'observer un nouveau cas de chromogénèse apparue dans une souche de notre collection : le « 418 » de l'Institut Lister à Londres, que nous repiquons régulièrement depuis plus de trois ans afin de le conserver.

Cette fois il s'agit de l'apparition d'un pigment rouge.

Dans une culture de ce germe sur gélose, au mois de mars 1935 nous avons remarqué une légère coloration rose à la partie inférieure du tube où la culture était la plus abondante. Le germe avait conservé *tous ses caractères typiques*, mais lorsque nous l'avons ensemencé sur pomme de terre nous avons eu la surprise de voir se développer au bout d'une dizaine de jours, une pigmentation

rouge très nette rappelant la coloration du *Prodigiosus*.

Cette propriété n'appartenait nullement à la souche primitive 418.

Il s'agit donc bien ici encore d'une véritable *mutation* dont nous poursuivrons l'étude au laboratoire.

Nous devons noter que les colonies obtenues par repiquage à partir des cultures sur pomme de terre, ne nous ont permis d'observer que la teinte légèrement rose des vieilles colonies sur gélose que nous avons signalée tout à l'heure ; elles conservent encore tous les caractères typiques du *Lactis-aerogenes* de Londres

Troisième mutation : Apparition d'un pouvoir protéolytique faible, coïncidant avec une mobilité précoce des bactéries en cultures très jeunes.

Nous savons qu'un des caractères classiques les plus importants des bacilles que nous étudions est leur *immobilité*. Or nous avons vu au chapitre I plusieurs germes mobiles en culture très jeunes Remy, PL, 516, 4.474 et 1.684. Ces bacilles pour lesquels nous avons pu mettre en évidence des cils fragiles et caducs retrouvent leur immobilité rapidement. Le PL très mobile encore à la 3^e heure de culture, dès la 5^e ou 6^e heure est devenu immobile. Le 516 au bout de 8 heures a également perdu sa mobilité. Pour les autres bacilles elle se maintient un peu plus longtemps mais au bout de 15 heures a totalement disparu.

Ayant découvert cette mobilité précoce au bout de plusieurs mois d'étude, nous avons repris récemment tous les caractères biochimiques de ces germes. Tous, sauf 1, restèrent et restent encore inchangés.

Action sur la gélatine. — Les souches PL, 516, 4.474 et 1.684 ensemencées en gélatine en Janvier 1936 ont présenté d'abord le clou caractéristique du Friedlander, puis nous avons pu noter des formations secondaires inattendues.

Au lieu de l'aspect habituel du clou surmontant une

pointe régulière avec ou sans bulles de gaz, on observe une cupule remplie de microbes qui pendant une quinzaine de jour ne s'accompagne pas de liquéfaction.

Au bout de 16 jours on note une véritable fusion de la gélatine limitée à sa partie supérieure. Au 22^e jour la liquéfaction toujours limitée à la partie supérieure est nette.

Nous reproduisons planche II quelques formations retenues au cours d'une nouvelle expérience que nous avons effectuée très récemment.

Le caractère protéolytique avait déjà été noté pour les souches *Remy* et 1684 mais faisait défaut au début de nos recherches pour PL, 516 et 4.474. Il apparaît donc encore comme une évolution de ces germes. Il reste néanmoins assez faible et ne se manifeste nullement vis-à-vis du sérum coagulé.

De la gélatine liquéfiée nous pouvons ensuite isoler à nouveau les germes mutés. Ils présentent toutes les autres propriétés des Pneumobacilles tant positives, aspect muqueux capsulés, développement en milieu de Koser, production d'acétyl-méthyl-carbinol, que négatives, absence d'indol en eau peptonée. Ce dernier caractère écarte l'interprétation de ces faits comme une mutation vers le type *Proteus* ou *Colibacille* (on n'observe en outre aucune fermentation en milieu lactosé).

La gélose lactosée tournesolée reste inchangée.

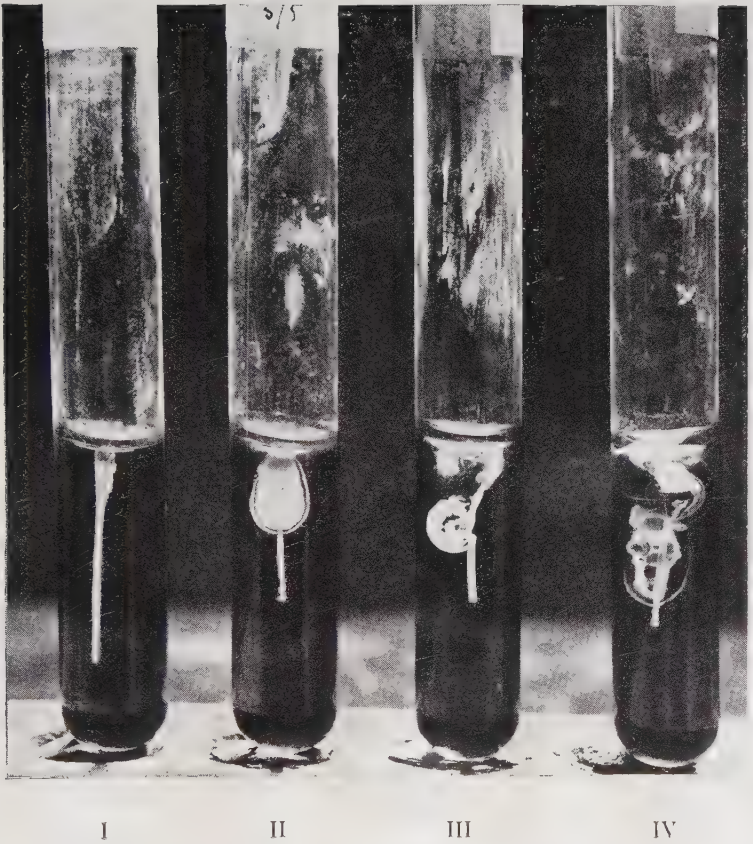
Il semble plutôt s'agir d'une évolution vers le type *Aerobacter cloacae* de JORDAN (1890).

Nous devons signaler cependant pour le 4.474 germe très muqueux, une atténuation de certaines propriétés.

Le développement en Koser et O' Meara se fait plus lentement que pour le microbe primitif et nous ne pouvons mettre en évidence l'acétyl-méthyl-carbinol par la réaction à la créatine qu'au bout de 3 jours. Primitivement elle était positive même au bout de 24 heures (fait pouvant être attribué au vieillissement du germe).

Par contre la souche 1684, au début de nos recherches ne manifestait son faible pouvoir protéolytique

PLANCHE II



Cultures en gélatine.

I. — Aspect classique. Clou.

II, III, IV. — Souches atypiques. Phases de prèliquéfaction.

Photo JEANTET. I. P.

vis-à-vis de la gélatine qu'au bout de 30 jours. Il y a donc une activation de cette propriété.

*
* *

Reprenant à la veille de la publication de ce travail tous les caractères généraux des 5 souches : Remy, PL, 516, 1684 et 4.474 qui, au début de nos recherches s'étaient présentées à nous comme des *Pneumobacilles* typiques, nous leur trouvons un ensemble de propriétés qui ne semble pas encore avoir été décrit par les auteurs et nous sommes amenés à faire de ces germes une véritable famille microbienne dont les caractères essentiels sont rassemblés dans le tableau IV.

*
* *

Ces phénomènes de mutation observés *in vitro* susceptibles de se produire *in vivo* viennent ajouter encore à la complexité de cette famille microbienne, et ils viennent aussi augmenter un nombre déjà très considérable de phénomènes analogues décrits par les auteurs à propos d'éléments microbiens de toute espèce.

TABLEAU IV

	Aspect	Mobilité		Capsules	Gélatine		Epr. O'Meara	Epr. Koser	Indol	Dédou- blement Eseuline	Fermen- tation Inositol	Fermen- tation Saccha- rose	Gélose lactosée- tourne- solée
		3 h.	24 h.		Clou	Liqué- faction							
<i>Pneumobacille typique</i>	Muqueux	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	virage variable
Type Ladouffit	Muqueux	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—
B. Ozène	Muqueux	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—
B. Rhinosclérome	Muqueux	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—
Type P. L.	Muqueux	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
516		+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
Rémy		+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
1.684		+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
4.474		+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—
<i>Colibacille typique</i>	Non Muqueux	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	variable	+

CHAPITRE V

OBSERVATIONS SUR LE POUVOIR TOXIGÈNE DE QUELQUES BACILLES

Dans ce chapitre nous allons étudier certains aspects du **pouvoir pathogène expérimental** de quelques-unes de nos souches microbiennes.

Pouvoir pathogène. Nous avons relaté au chapitre I les manifestations les plus fréquentes de ce pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux. Là, comme dans les infections réalisées expérimentalement au laboratoire, le Pneumobacille ne paraît pas se comporter en germe particulièrement toxique. Il semble agir surtout par sa virulence : envahissement précoce et massif des humeurs et organes.

On sait que ce *pouvoir pathogène* est extrêmement *inégal* suivant les échantillons étudiés.

Certaines souches ne tuent même pas la souris, à la dose de 1/2 cc. Pour d'autres au contraire, la dose mortelle est 10—⁵ cc. voire même 10—⁶. Ces derniers échantillons tuent le cobaye et le lapin à la dose de 1 cc. sous-cutané.

Les *lésions déterminées* varient aussi suivant que l'affection produite évolue d'une façon aiguë (septicémie avec congestion des viscères) ou subaiguë (localisation sur les séreuses).

A l'autopsie nous trouvons le microbe en abondance dans la rate, le liquide d'épanchement péritonéal, et il présente alors un bel aspect capsulé que les colorations les plus simples mettent en évidence.

Etant donné que nos souches étaient en grande partie

des souches de collection et que, par suite de leurs repiquages successifs elles ne possédaient plus leur virulence initiale, nous n'avons pas éprouvé systématiquement leur virulence.

Les souches récemment isolées, *Ladouffit*, *Honoré*, *Eude*, *Gran*, et celles provenant de l'épizootie des cobayes de *Madagascar* S_2 , S_3 , S_4 , S_6 , S_7 , se sont montrées mortelles pour les animaux de laboratoire à des doses variables.

Pouvoir toxique. — Dans certains cas, nous avons observé très rapidement après l'inoculation, un état d'abattement plus en rapport avec l'existence de substances toxiques dans le milieu, qu'avec un envahissement microbien généralisé.

Comme pour les germes voisins : Colibacille, bacille Paratyphique B, nous avons pensé qu'il pouvait être intéressant d'étudier une toxigénèse possible.

On sait en effet depuis les travaux de VINCENT que le Colibacille peut donner une toxine soluble; et d'autre part, certains Paratyphiques B et principalement ceux isolés des intoxications alimentaires sont nettement toxigènes.

Entre les mains de la plupart des auteurs, les recherches sur la toxine de Friedlander n'ont donné que des résultats négatifs ou douteux.

Dès 1892 cependant J. DENYS et BRION décrivent, mais sans apporter d'expériences probantes à ce sujet, un principe toxique du bacillus *Lactis aerogènes*.

En 1914 et 1916, ROCHAIX et P. DURAND produisent chez le lapin, au moyen de filtrats de cultures de Friedlander des réactions locales pulmonaires intéressantes, mais pas d'intoxication générale.

PAPACOSTAS et GATÉ en 1921 s'attachant au problème de l'antagonisme du bacille de Friedlander et du bacille Diphtérique montrent que, dans un filtrat de culture de Pneumobacille ramené au pH alcalin favorable, la production de toxine diphtérique est nettement inférieure à celle obtenue dans le milieu neuf initial.

MEGRAIL en 1926 signale aussi une certaine toxicité faible et inconstante dans les filtrats de culture de Friedlander provoquant seulement des phénomènes diarrhéiques chez le lapin.

Enfin FREEDLANDER et SCHOENHOLZ en 1927 obtiennent, par injection intra-veineuse de cultures filtrées d'une bacille de Friedlander, isolé au cours d'une épidémiologie chez les cobayes, une intoxication du lapin, réalisant le tableau de la congestion pulmonaire aiguë mortelle avec mort en temps variant de cinq à vingt-quatre heures.

En outre pour ces auteurs dans les cultures anaérobies existerait une 2^e toxine non spécifique et moins active.

M. LÉVY-BRUHL et M^{me} LEGRAND en 1930 ont réussi également à mettre en évidence dans des filtrats de culture en milieux chimiquement définis, une substance toxique pour le lapin.

Le microbe provenait d'une infection pyohémique mortelle chez l'homme. Le filtrat d'une culture de quatre jours était injecté par voie intraveineuse à un lapin à la dose de 1 cc. par kg. L'animal succombait en douze heures environ. Par contre ce même filtrat n'avait aucun effet chez le cobaye et la souris.

Nous-même en étudiant le microbe HONORÉ provenant du Service du D^r R. BENARD à l'Hôpital Laënnec, nous avons pu constater une action toxique non seulement chez le lapin, mais également chez le cobaye et la souris (mars 1935).

Caractères du germe. — Le germe avait été isolé d'un épanchement pleural où il existait en culture pure et abondante. Il se présentait comme un bacille de Friedlander tout à fait typique : gram-négatif, immobile même en culture très jeune, donnant en bouillon une culture abondante avec collerette épaisse à la surface du tube, sur gélose des colonies muqueuses, en gélatine un « clou » caractéristique. Les propriétés biochimiques du germe

confirmaient ce diagnostic microbiologique ; on constatait, en effet, un développement abondant sur milieu, de Koser, une réaction de l'acétyl-méthyl-carbinol nettement positive dans les cultures en milieu glucosé ; seul faisait encore défaut parmi les caractères classiques le virage au rouge de la gélose lactosée tournesolée, épreuve dont les résultats sont, en réalité, très inconstants. En outre, les épreuves d'agglutination et de précipitation par un sérum de lapin anti-Friedlander donnaient un résultat positif.

La virulence expérimentale du microbe se montrait très accusée tant pour le lapin que pour la souris (dose mortelle 10—⁵) et le cobaye (dose mortelle 1/2 cc.) le développement d'une escarre au point d'injection, de même que l'état d'abattement apparaissant précocement chez les lapins et les cobayes inoculés nous amenaient à supposer que dans les cultures filtrées pourrait être mise en évidence une toxine soluble. En effet nous avons cultivé le germe dans le milieu suivant :

Phosphate d'ammoniaque	1 gr.
Phosphate de potasse	1 gr.
Chlorure de sodium.	1 gr.
Sulfate de magnésie.	0,2
Glucose	1 gr.
Acétate de soude	5 gr.
Eau distillée q. s. pour	1 litre

On obtient une culture abondante et la production d'acide aux dépens du glucose se trouvant tamponnée par l'acétate de soude, la réaction du milieu se maintient au pH initial, soit 7,8.

Isolement de la toxine. — Après sept jours d'incubation à 35°, on procède à la centrifugation, puis à la filtration sur bougie CHAMBERLAND L₃. Le filtrat est éprouvé sur lapin, cobaye et souris.

Son activité. — Chez le lapin, on obtient, à la dose de 1,8 cc. par kgr. (voie intraveineuse), l'intoxication subaiguë avec mort en douze heures ; à dose plus faible l'amaigrissement progressif entraînant la mort en une huitaine de jours.

Chez le cobaye (300-350 gr.), l'injection de 3 cc. de filtrat par voie sous-cutanée amène la mort, qui peut survenir très rapidement en six heures, avec le tableau habituel de l'intoxication : animal immobile, dyspnéique, présentant de la catatonie, le poil hérissé. A l'autopsie on trouve une congestion intestinale très marquée sans tuméfaction des ganglions mésentériques, et de la congestion du foie, des reins et des surrénales. Au point d'injection du filtrat on observe, quand l'animal a survécu quelques jours, le développement d'une escarre humide.

L'examen histologique des lésions viscérales a été pratiqué par M^{lle} GAUTHIER-VILLARS que nous remercions vivement de son obligeant et très précieux concours. Elle a trouvé dans les divers organes et principalement dans les reins et le foie des réactions congestives, en général très accusées, sans altération des cellules glandulaires. Mêmes constatations **chez la souris** qui succombe en vingt-quatre heures à l'injection de 0,5 cc. de filtrat par voie sous-cutanée. Par contre on n'observe pas d'action toxique chez le pigeon, injecté par voie intramusculaire ou intraveineuse.

L'activité du filtrat n'est pas affaiblie par le chauffage à 60° pendant trois quarts d'heure, ce qui est à rapprocher du fait que la réaction du biuret, pratiquée sur ce liquide toxique se montre négative. Il pourrait donc s'agir d'une substance non protéinique. On peut se demander alors s'il ne s'agit pas d'une amine, étant donné que certains caractères de cette intoxication se rapprochent des phénomènes provoqués par l'histamine. Cependant nous n'avons pu jusqu'à présent confirmer cette hypothèse (LOEPER 1934).

Ce pouvoir toxigène que nous avons mis en évidence d'une façon incontestable reste cependant un fait exceptionnel et qui d'ailleurs ne persiste pas longtemps dans les échantillons conservés *in vitro*, même après incorporation des germes à la gélatine.

CONCLUSIONS

Les recherches poursuivies au cours de ce travail ont porté sur 42 bacilles muqueux et capsulés de provenances diverses. Laissant de côté les problèmes du pouvoir pathogène et des classifications sérologiques nous nous sommes attachés à l'étude des *propriétés morphologiques et biochimiques*.

Le chapitre I est consacré à l'historique et aux généralités.

Au chapitre II nous avons confirmé les données classiques sur l'aspect des cultures, les formes *Smooth* et *Rough* et sur les caractères microscopiques : bacilles de dimensions inégales à Gram franchement négatif, et généralement entourés d'une capsule. Pour la mise en évidence de celle-ci nous avons pratiqué la série des techniques décrites jusqu'alors. Les résultats ont été souvent satisfaisants mais jamais constants.

Un point nous a frappé qui ne paraît pas encore avoir été signalé, c'est la **coloration bipolaire** des corps microbiens eux-mêmes, coloration qui se manifeste même sur des préparations obtenues à partir des cultures et dont nous reproduisons une image caractéristique.

Ces germes capsulés sont considérés classiquement comme tout à fait *immobiles*. Or, nous avons pu, pour 5 de nos souches percevoir une **phase passagère de mobilité** dans les cultures toutes jeunes, et déceler par une technique de coloration récemment mise au point par le Dr LEVENSON, la présence de **cils caducs**, agents de ces mouvements très manifestes.

Au chapitre III nos recherches biochimiques ont porté sur (I) la *nutrition azotée* et (II) la *nutrition carbonée* de ces bacilles.

I. — 1° Confirmant les données de certains auteurs nous avons constaté un développement abondant dans les milieux où la source d'azote est constituée par les **sels ammoniacaux**.

2° Nous avons montré que l'**urée** en présence de glucose constitue aussi un excellent aliment azoté. Son assimilation dans un tel milieu se traduit par une alcalinisation nette consécutive à une acidification due à la consommation du glucose.

3° Les **amino-acides** conviennent également au développement microbien.

4° Il en est de même des **peptones** aux dépens desquelles 2 de nos échantillons seulement ont produit de l'**indol**.

5° L'épreuve de la **gélose au plomb**, dans 7 p. 100 des cas nous a donné un résultat positif.

6° Enfin, nos germes cultivés en eau **peptonée nitrée** ont manifesté une action réductrice nette se traduisant le plus souvent par formation de **nitrites**, parfois même d'**azote**.

II. — Dans l'attaque de la molécule carbonée au contraire, nos échantillons microbiens se sont montrés des agents oxydants. Nous avons envisagé successivement l'assimilation de certains acides organiques, sucres et alcools.

1° Les **acétates** sont les acides les plus simples pouvant être utilisés par 55 p. 100 de nos souches comme seule source de carbone en milieu synthétique. Cette assimilation se traduit par une forte alcalinisation de milieu. Nous en avons approfondi le métabolisme résultant : 80 à 85 p. 100 de l'acétate utilisé sont consommés par un *Pneumobacille* typique et le carbone est retrouvé en grande partie (70 p. 100) environ sous forme de carbonates

et de CO_2 libre. Il se forme également des traces de méthane.

2° En ce qui concerne les **citrates**, nous avons confirmé la valeur diagnostique importante de l'épreuve de Koser. Nous en avons fait une application pratique en proposant un milieu gélose-citratée pour les isoléments microbiens.

3° Parmi les sucres, le **glucose** s'est montré particulièrement favorable à la culture de nos germes. Son utilisation s'est traduite le plus souvent par la formation d'acétyl-méthyl-carbinol (épreuve de Voges-Proskauer). Nous avons montré que la production de ce corps, pour rester un test de diagnostic entre le groupe **Coli** et le groupe **Aerogenes** doit être assez abondante et les procédés utilisés pour sa recherche ne doivent pas présenter une extrême sensibilité ; en effet, nous avons pu mettre en évidence, dans des cultures de Coli-bacilles authentiques par ailleurs, des quantités appréciables de cette substance.

4° La fermentation du **lactose** est considérée comme un caractère habituel du *Pneumobacille* ; en réalité l'épreuve de la gélose lactosée tournesolée n'a manifesté de virage au rouge que pour une faible proportion de nos souches. Il ne paraît pas y avoir concordance entre cette épreuve, celle de la coagulation du lait et l'acidification du petit lait tournesolé, qui semblent plutôt coïncider avec la fermentation du lactose source unique de carbone en milieu synthétique.

5° La fermentation du **saccharose** a été également indiquée comme épreuve différentielle entre les bacilles du colon et les *Aerogenes*. Ces derniers d'après les classiques fermentent ce sucre. Personnellement nous n'avons eu de résultats positifs qu'avec 80 p. 100 de nos échantillons.

6° De cette épreuve on a rapproché l'étude de la **fermentation** de l'**inosite**, que nous avons effectuée. Nous avons obtenu 66 p. 100 de résultats positifs. Nous avons rencontré 5 échantillons ne fermentant ni l'inosite, ni le saccharose, à l'instar des *Acidi lactici* de PRANGE, mais

par ailleurs nos germes diffèrent totalement de ceux de cet auteur lesquels par leurs caractères se rapprochaient davantage du Colibacille.

7° Les bacilles qui provoquèrent la fermentation de l'inosite se montrèrent tous capables de dédoubler l'**esculine** en provoquant le noircissement d'une gélose esculinée-citratée.

Cette dernière épreuve nous paraît constituer un bon élément diagnostique en raison de sa commodité, de sa netteté, et du fait que les expériences pratiquées avec le Coli-bacille restèrent négatives.

8° Enfin nous avons ébauché l'étude du développement microbien en milieu synthétique contenant l'**alcool éthylique** comme source unique de carbone. Un certain nombre de nos germes ont pu assimiler cette substance ; ce fait nous paraît intéressant en raison du petit nombre des espèces microbiennes et surtout d'espèces pathogènes ayant donné lieu à une étude de ce genre.

Une telle hétérogénéité dans les caractères biochimiques de germes présentant des caractères morphologiques analogues montre combien il est difficile d'établir une classification nette et une barrière précise entre les 2 espèces typiques :

Pneumobacilles et Colibacilles.

Pour la pratique du laboratoire et le diagnostic nous conviendrons de désigner sous le terme Pneumobacille tout microbe muqueux, immobile en cultures de vingt-quatre heures, capsulé, donnant le clou en gélatine et offrant comme caractères biochimiques l'absence d'indol en eau peptonée, le développement sur milieu de Koser et la production d'acétyl-méthyl-carbinol, en milieu d'O'Meara.

Un Coli-bacille vrai sera au contraire un germe présentant les caractères absolument opposés.

Par ordre décroissant de valeur diagnostique nous

proposons ensuite : l'épreuve de l'esculine, celle de l'inosite et du saccharose.

Nous rattacherons cependant au *Pneumobacille* les bacilles muqueux se différenciant seulement des précédents par une réaction d'O'MEARA négative.

Parmi ces germes certains paraissent jouer un rôle pathogène intéressant : tel est le bacille de l'Ozène, celui du Rhinosclérome et celui du Granulome inguinal. Les tableaux résumant les caractères généraux établissent leur parenté avec les espèces typiques.

Au chapitre IV nous avons ensuite relaté des phénomènes de mutations bactériennes observées dans des souches de notre collection.

1° L'apparition d'un pigment jaune d'or dans une souche primitivement incolore, pigment se manifestant sur tous les milieux, ne diffusant pas, mais semblant coïncider avec une moindre vitalité du microbe et une atténuation de certaines de ses propriétés biochimiques.

2° L'apparition d'un pigment rouge dans une autre souche, pigment se manifestant seulement sur pomme de terre.

3° Enfin l'acquisition pour certaines bactéries d'un pouvoir protéolytique très faible vis-à-vis de la gélatine, sans action sur le sérum coagulé, et semblant coïncider avec une mobilité précoce et très passagère.

De ces derniers germes atypiques par ces 2 propriétés, auxquels manquent également le pouvoir de fermenter l'inosite et de dédoubler l'esculine nous sommes conduits à faire un groupe à part, formant comme une sorte de famille microbienne bien particulière. Il ne semble pas que des bacilles présentant cet ensemble de caractères aient déjà été rencontrés et décrits.

Au chapitre V enfin, ayant constaté l'apparition des phénomènes d'ordre toxique chez quelques animaux

inoculés avec certaines de nos souches, nous avons recherché et pu mettre en évidence l'existence d'une **toxine soluble** dont les effets se sont manifestés non seulement chez le lapin comme on l'avait déjà observé, mais aussi chez la souris et le cobaye.

Vu : le Président du Jury,
LUTZ

Vu : le Doyen,
GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- AITOFF (M), DOBKEVITCH (H.), DION (M.). — Bacille jaune isolé d'une entérite aiguë et présentant les caractères du bacille de Friedlander. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXIX, p. 710, 1935.
- ARKWRIGHT (J. A). — Variation in Shiga disenterly and other bacteria in agglutination by salts and serum Rough and Smooth colonies. *J. Path. and Bact.*, t. XXIII, p. 358, 1920, t. XXIV, p. 36, 1921.
- AUBEL et COLIN. — Action des sucres sur la fonction pigmentaire du bacille Pyocyanique. *C. R. Soc. Biol.* t. LXXV, pp. 25-27, 1913.
- AYERS (S.H.), RUPP (P.) and JOHNSON (W. T.). — A Study of the alkaliforming bacteria found in milk. *U. S. Dept. Agr. Bull.* 782 pp. 1, 38, 1919.
- BANNING (F). — Zur Kenntnis der Oxalsäurebildung durch Bakterien *Zentr. f. Bak II Abt. Orig.*, VIII pp. 295-398, 1902,
- BANTI. — Lo sperimentale. 1888.
- BARAT (L). — Les bactéries suspectes des bières flamandes, *thèse médecine* Paris, 1916.
- DE BARROS BARREBO (J.), PACHECO (G.). — O grupo Coli-Aerogenes, como indice de contaminação fecal das águas de abastecimento. *Arch. of Hyg.* t. II, p. 18, 1928.
- BARTHEL (Ch.). — Différenciation du groupe Coli-Aerogenes du lait *Le « lait »* t. XIV, n° 137, pp. 673-683, 1934.
- BEAUREFAIRE, ARAGAO et VIANNA. — *Mem. de Inst. Oswaldo Cruz.* Rio-de-Janeiro t. IV, p. 211, 1912.
- BERGEY (D. H.). — *Manual of determinative Bacteriology.* 4^e Ed. Williams et Wilkins Company Baltimore, 1934.
- BERMAN (N.) and RETTGER (L.F.). — Bacterial nutrition : further studies on the utilisation of protein and non protein nitrogen. *J. Of Bact.* III p. 389, 1918.

- BERTHELOT (A.) et BERTRAND (D. M.). — Sur quelques propriétés biochimiques du *Bacillus Aminophilus intestinalis*. *C. R. Ac. des Sciences*, t. CLIV p. 1826, 1912.
- BORIN (P.). — Capsules du Pneumobacille de Friedlander. Considérations sur les capsules microbiennes. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1925.
- BRAUN (H.) et CAHN-BRONNER (C. E.). — Über die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. *Zentr. f. Bakt. I Abt. Orig.* t. LXXXV pp. 196, 380, 1921.
- BROWNE (C. A.). — The effect of fermentation upon the composition of cider and vinegar. *J. Of Amer. Chim. Soc.* t. XXV pp. 16, 33, 1903.
- BUCHANAN (R. E.) and FULMER (E. I.). — *Physiology and biochemistry of Bacteria*. t. II p. 436, 437, 1930, t. III p. 240. 1930.
- COTONI (L.) et POCHON (J.). — Sur les variations des Pneumocoques conservés en dehors de l'organisme. *Ann. I. P.* t. LV p. 294, 1935.
- DIENERT (F.). — Examen bactériologique des beurres, le « Lait » t. XII, n° 120, pp. 1055-1058, 1932.
- DENYS (J.) et MARTIN. — Sur les rapports du Pneumobacille de Friedlander, du ferment lactique et quelques autres organismes avec le bacille lactis aerogènes et le Bac. Typhosus *La « Cellule »* t. IX, pp. 261, 293, 1893.
- DENYS (J.) BRION. — Étude sur le principe toxique du *bacillus Lactis aerogenes*. *La « Cellule »* t. VIII, pp. 305, 332, 1892.
- DUBOS (R.) et AVERY (O. T.). — *J. Exp. Med.* t. LIV, p. 471, 1931.
- DUJARRIC de la RIVIÈRE (M. R.) ; et CHU (T. M.). — Sur quelques techniques d'isolement et d'identification des microbes des eaux. *Revue d'Hyg. et de Med. Prev.* t. LIII n° 4, 1931.
- EISENBERG. — Variabilität in der Typhus-Coligruppe. *Zentr. f. Bakt. I. Abt. Orig.* t. LXXX p. 385, 1918.
- FERNBACH (A.) et SCHOËN (M.) et HAGIWARA (S.). — Quelques

- observations sur la formation des gommies par les bactéries. *C. R. Soc Biol.* t. XCII p. 1418, 1925.
- FREEDLANDER (B. L.) et SCHÖENHOLZ (P.). — Toxic substances in Friedlander's *Bacillus* cultures. *Proceed. of soc. for exp. biol. and med.* t. XXIV p. 555, 1927.
- FRIEDLANDER (C.). — 1° *Fortsch. der med.* t. I p. 319, 1882.
2° Die Mikrokokken der Pneumonic *Fortsch. der med.* t. I pp. 715, 733 1883.
- FRITSCH. — Zur Actiologie des Rhinoskleroms. *Wien. Med. Wochenschr.* 1882.
- GARA VON (P.). — Recherches sur la variabilité des bacilles typhiques et des bacilles jaunes. *Zentr. f. Bakt. I. Abt. Orig.* CXXIX p. 81, 1933.
- GATE. — La pneumobacillo-diphérie. *Bull. Soc. Med. Hop. de Paris*, III^e série, p. 1679, 1926.
- GESSARD. — Des races de bacille Pyocyanique. *Ann. I. P.* t. V. p. 65, 78, 1891.
- GORY (M.). — Action des eaux résiduaires sur quelques bacilles pathogènes intestinaux et sur le bacille du colon. *Thèse médecine.* Paris 1926.
- GRAG (Allan). — The significance of *Bact. Aerogenes* in water. *J. of Hyg.* t. XXXII pp. 132, 142. 1932.
- GRIFFITH (F.). — Reports on Public Health and Med. Subjects *Min. of. Health* n° 18. Londres 1923.
- GRIMBERT (L.). — Production de l'acétyl-méthyl-carbinol par le *Bacillus Tartricus*. *C. R. Ac. des Sc.* t. CXXXII, p. 705-1901.
- GRIMBERT (L.) et LEGROS. — De l'Identité du Bacille lactique *Aerogenes* et du Pneumobacille de Friedlander. *Ann. I. P.* pp. 479, 486, 1900.
- GRIMES ET HEMERTY. — Bacteria Belonging to the sub. Genus *Aerobacter* *Sc. Proc. Req. Dublin Soc.*, t. XX, pp. 89-97, 1931.
- HAMM. — *Zentr. f. Bakt. I. Abt. Orig.* t. XLIII-1907.
- HANKE (M. T.) et KÖSSLER (K. K.). — The production of histamine and other imidazoles from histidine by the action of micro-organisms. *J. Biol. Chim.*, t. L, p. 131, 1922.
- HARDEN (A.). — On Voges Proskauer's reaction for certain bacteria. *Proc. Roy. Soc.*, t. LXXVII, p. 424. 1906.

- HARDEN (A.) AND NORRIS (D.). — The diacetyl reaction for proteins *J. Physiol.*, t. XLII p. 332. 1911.
- HARDEN (A.) AND WALPOLE (G. S.). — The chemical action of « *B. Lactis aerogenes* » on glucose and mannitol. Production of 2-3 butylène-glycol and acetyl-methyl-carbinol. *Proc. R. y. Soc.*, t. LXXVII. p. 339. 1906.
- HARRISON AND VAN DER LOCK. — *Zentr. f. Bakt. II.* XXII, p. 547. 1909.
- HAUDUROY (P.) DUHAMEL, EHRINGER et MONDIN, — Sur un bacille inconnu retiré d'une méningite. *C. R., Soc. Biol.* t. CX, p. 362, 1932.
- HEES (H) UND TROPP (C). — Vergrärung substituter Kohlehydrate durch bacterien der Coli und Lactis aerogenes Grupp. *Zentr. f. Bakt. I. Abt. Orig.* T. LXXXVI p. 273, 1926.
- HOPKINS (F. G.) AND COLE S. W.). — The constitution of tryptophane and the action of bacteria upon it. *J. Physiol.*, t. XXIV, p. 451, 1903.
- HUEPPE. — *Kaiserl. Gesundh. Bl.* II, 1884.
- JAMES, CROSNIER et MOREL. — Action des germes intestinaux sur la gélose à l'esculine. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXIX, p. 849, 1935.
- DE JONG (L. E.) DEN DOOREN. — *Beijdragetot de Kennis van het Mineral precoces Delft*, 1926.
- JULIANNELLE. — Bacterial variations in cultures of *Friedlander's bacillus*. *J. Exp. Med.*, t. XLVII, pp. 889, 902. 1928.
- KLEBS. — *Arch. For Exper. Path.*, t. IV.
- KOSER (S. A.). — 1° Correlation of citrates utilisation by members of colon *Aerogenes* group with other differential characteristic and with habitat. *J. of Bact.* t. XI, pp. 61-77, 1924. 2° Further observations of utilisation of the salts of organic acids by the colon *Aerogenes* group. *J. of Bact.* t. XI p. 409-416, 1926.
- KRAUSS (E. J.). — Ueber ein neues menschen pathogenes Kapselbakterium. *Zentr. f. Bakt. I Abt. Orig.* t, IXC, pp. 497-505, 1926.
- KUMAGAWA (H.). — *Bioch. Zeitschr.*, t. CXXXI, p. 157, 1922.
- LEMIERRE. — *Traité de Microbiologie*. Nattan-Larrier, t, II, p. 225, 1935.

- LEMOIGNE (M.), Reaction spécifique du 2-3 butylène glycol et de l'acétyl méthyl-carbinol, produits de la fermentation butylène glycolique *C. R. Ac. des Sc.*, pp. 131-192, 1920.
- LEMOIGNE (M) ET MONGUILLON (P). — Présence de l'acétyl-méthyl carbinol et du 2-3 butylène-glycol dans le sang des animaux supérieurs. *C. R. Ac. des Sciences*, t. CXIC, p. 80. 1930.
- LEVENSON (S.). — De la mobilité du *Bac. bifementans*. *Soc de Biol.*, t. CXXI, n° 3, pp. 221-223, 1936.
- LEVY-BRUHL (M.) ET LEGRAND (M.) (1) Culture du Pneumobacille sur milieux chimiques définis. *C. R. Soc. Biol.*, t. CIII, p. 1070, 1930.
- (2) Sur la toxine soluble du Pneumobacille. *C. R. Soc. Biol.*, t. CV. p. 263. 1930.
- LEVY-BRUHL (M.) ET CADO (Yv.). — (1) Toxine soluble du Pneumobacille active chez le lapin, le cobaye et la souris. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXVIII, p. 954, 1935.
- (Yv.) (2) Un cas de mutation bactérienne. Chromogénèse apparue dans une souche du Pneumobacille conservée depuis 18 mois *C. R. Soc. Biol.*, t. CXVII, p. 1160, 1934.
- LISPSKA (IRÈNE). — Etude biochimique sur les bacilles du groupe Coli-aerogenes du lait. *Le « lait »*, t. XIV, n° 137, pp. 973-983, 1934.
- LOEPER (M.) PERRAULT (M.) ET LEURE (A.). — Syndromes histaminiques d'origine intestinale. *Bull. Ac. de Med.*, n° 38, 1934.
- LÖHNIS. — *Précis de Bactériologie Agricole*. Traduit de l'allemand par H. Küfferath. Bruxelles, p. 87, 1912.
- LWOFF (A.). — Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires. *Monographie de l'I. P.* Masson et Cie éd., pp. 33-34, 1932.
- MARCHAL (J.-G.). — Variation et mutation en Bactériologie. *Thèse Sciences*. Paris, 1932.
- MAZEPORA (N.). — La formation du pigment jaune chez le Colibacille. *Travaux Inst. Hyg. de l'État Tchéco-Slovaque*, t. II, p. 14, 1931.
- MEGRAIL. — Toxicity of filtrates of *B. Friedlander*. *Proc. Soc.*

- for. exp. *Biol. and Med.*, t. XXIII, pp. 655-656, 1926.
- NETTER (A.). — 1° Du microbe de Friedlander dans la salive. *C. R. Soc. Biol.*, p. 799, 1887.
- 2° Agents pathogènes de la broncho-pneumonie. *Soc. Méd. des Hôp.*, t. VI, p. 390, 1889.
- 3° Utilité des recherches bactériologiques pour le pronostic et le traitement des pleurésies purulentes. *Soc. Méd. des Hôp.*, t. VII, p. 441, 1890.
- NICOLLE (M.) JOUAN, (C.) et DEBAINS (E.). — Note sur les bactéries inagglutinables. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXI, p. 839, 1918.
- O'MEARA (K.-A.). — A simple delicate and rapid method of detecting the formation acetyl-methyl-carbinol by bacteria fermenting carbohydrate. *J. Path.*, t. XXXIV, pp. 401-406, 1931.
- PALTAUF et EISELSBERG. — Tageblatt 59^e Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte, Berlin.
- PRANGE (G.). — *Bacterium acidi lactici* Hueppe und seine systematische Stellung auf Grund Seiner Eigenschaften. *Zentr. f. Bakt. II Abt. Orig.*, t. XCII, p. 305, 1935.
- PAPACOSTAS et GATÉ. — A propos de l'antagonisme du Loëffler et du Friedl. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXV, p. 1038, 1921.
- ROCHAIX (A.). — Milieux à l'esculine et Coli-bacilles. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIX, p. 1042, 1923.
- *Ibid.*, t. XC, p. 771, 1924.
- ROCHAIX (A.) et SARDA (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, t. XCV, p. 841, 1926.
- ROCHAIX (A.). — A propos de l'action des germes intestinaux sur la gélose à l'esculine. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXX, p. 217, 1935.
- ROCHAIX (A.) et DURAND (P.). — 1° Action des toxines du Pneumobacille de Friedlander sur la plèvre par inoculation directe. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXVII, p. 380-420, 1914.
- 2° Action des toxines du Pneumobacille de Friedlander sur le poumon, par inoculation intrachéale chez le lapin. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXVII, p. 423, 1914.

- 3° Réactions pleurales au cours des lésions pulmonaires produites par les toxines du Pneumobacille chez le lapin. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXIX, p. 407, 1916.
- RUCBHOF, KALLAS, BEN-CHIN et CONLTER. — Coli *aerogenes* differentiation in Water analyses. *J. of Bact.*, t. XXII, pp. 125-126, 1931.
- SEYDEL (J.). — Sur les propriétés biochimiques et sérologiques du *B. typhi flavum*. *Ann. I. P.*, t. III, pp. 179-192, 1934.
- STEPHENSON (M.). — *Bacterial metabolism. Monogr. on Bioch.*, 1930.
- THUNBERG (T.). — Zur Kenntnis des intermediären stoffwechsels und der dabei Wirksamen Enzyme. *Skand. Arch. Physiol.*, t. XL, pp. 1-91, 1920.
- TITSLER (R.) et SANDHOLZER. — Studies on the *Escherichia Aerobacter* intermediates. *J. of Bact.*, t. XXIX, p. 349, 1935.
- TOENNIESSEN. — Untersuchungen über die Kapsel (Gummihülle) der pathogenen Bakterien. *Zentr. f. Bact I. Abt. Orig.*, t. LXXXV, p. 225, 1921.
- VOGES (O.) und PROSKAUER (B.). — Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differential diagnose der hämorrhagischen Septicämie. *Z. Hyg.*, t. XXVIII, p. 20, 1898.
- WEICHSELBAUM (A.). — Über aetiologie und pathologische Anatomie den akuten Lungentzündungen. *Wein. Med. Woch.*, pp. 1301, 1305, 1339, 1344, 1367, 1371, 1887.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION.	9
PLAN.	10

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS

HISTORIQUE DU PNEUMOBACILLE DE FRIEDLANDER ET DES BACILLES VOISINS	11
GÉNÉRALITÉS.	13
Leur fréquence — leur répartition.	13
Leurs conditions générales de développement	13
Leur rôle pathogène chez l'homme et les animaux. .	14

CHAPITRE II

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

1° ASPECT DES CULTURES SUR MILIEU SOLIDES	16
ASPECT DES CULTURES SUR MILIEU LIQUIDES	18
2° ASPECT MICROSCOPIQUE :	
a) A l'état vivant : Immobilité	19
Quelques germes mobiles en cultures très jeunes .	20
b) Après coloration : Gram	21
Aspect bipolaire	21
Capsule (technique de colorations)	22
Gils	22

CHAPITRE III

ETUDE BIOCHIMIQUE

	Pages
1° NUTRITION AZOTÉE :	
Utilisation de l'ammoniaque	27
Utilisation de l'urée	28
— des acides aminés	29
— de l'histidine	29
— des peptones (Indol)	30
Culture sur gélose du Plomb	30
— en gélatine.	31
Réduction des nitrates	33
2° NUTRITION CARBONÉE :	
Utilisation des sels d'acides organiques : carbonates .	36
Formiates .	36
Acétates (Métabolisme) : Recherches quantitatives.	
Recherches qualitatives. Etudes des Gaz formés	
pendant la culture. Conclusions.	59
Citrates (Epreuves de Koser).	60
Lactates. Succinates.	62
Utilisation des acides aminés	62
Utilisation de l'urée	62
Utilisation des sucres : a) Glucose	63
Etude de la production d'acétyl-méthyl-carbinol :	63
Procédés de recherches	64
Technique d'O'MEARA	65
b) Lactose	69
1) Gélose lactosée tournesolé.	69
2) Milieu synthétique de lactose	69
3) Lait tournesolé	70
4) Petit lait tournesolé.	70
c) Saccharose	71
Utilisation de l'inosité	71
Utilisation de l'alcool éthylique	73
Utilisation de l'esculine	74

CHAPITRE IV

MUTATIONS OBSERVÉES DANS QUELQUES SOUCHES BACTÉRIENNES.

1° Apparition d'un pigment jaune d'or	81
2° Apparition — — rouge (sur pomme de terre).	84
3° Apparition d'un faible pouvoir protéolytique vis-à- vis de la gélatine	85

CHAPITRE V

OBSERVATIONS SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE ET LE POUVOIR TOXIQUE DES PNEUMOBACILLES

1° Pouvoir pathogène	89
2° Pouvoir toxique	90
Isolement d'une toxine	92
Son activité	92
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	94
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	100

Impr. de la Fac. de Méd., Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris. — 6-36
